



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Aflatoxine in Trockenfrüchten:
Eine Erhebung am österreichischen Markt

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat)

Verfasserin:	Beata Brigitta Feiler-Faragó
Studienrichtung:	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat techn. Ebrahim Razzazi-Fazeli
Institut:	Institut für Tierernährung der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Wien, am 10.01.2011

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen um mich in angemessener Form bei Herrn Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat techn. Ebrahim Razzazi-Fazeli für die freundliche Betreuung und Hilfestellung, die maßgeblich zum Gelingen meiner Diplomarbeit beitrug und für eine lehrreiche Laborzeit zu bedanken. Durch sein persönliches Engagement repräsentiert er ein außergewöhnlich forschungs- und studentenfreundliches Institut.

Vielen Dank auch an alle Institutsmitarbeiter der Veterinärmedizinischen Universität Wien für Tierernährung, die stets hilfsbereit und offen für alle Ablaufprobleme zur Verfügung waren.

Ganz besonderen Dank an Frau Dr. Elisabeth Viktoria Reiter, die mit ihren stets konstruktiven Fragestellungen den Verlauf der Studie vorangetrieben und begleitet hat.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mir das Studieren ermöglicht haben und mir in all den Jahren zur Seite gestanden sind.

Besonders großer Dank gebührt meinem Mann für die Motivation, für seine Fürsorge und für seine liebevolle Hingabe.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von AFB ₁ und AFB ₂	- 13 -
Abb. 2: Strukturformel von AFG ₁ und AFG ₂	- 13 -
Abb. 3: Strukturformel von AFM ₁ und AFM ₂	- 13 -
Abb. 4: Aufbau einer HPLC-Apparatur.....	- 29 -
Abb. 5: Schematischer Ablauf der Aflatoxinbestimmung in Trockenfrüchten und Nüssen	- 42 -
Abb. 6: Slurry einer Aprikosenprobe (Wasser/Probe; 1/1, v/v).....	- 1 -
Abb. 7: Abfiltrieren der Slurryproben nach der Extraktion	- 45 -
Abb. 8: Unterschiedliche Probenfiltrate (2 Feigen, Rosinen, Sultaninen).....	- 45 -
Abb. 9: Darstellung einer Vakuumkammer zur Probenaufreinigung mittels IACs -	47 -
Abb. 10: Eluate zweier Feigenproben vor dem Abdampfen.....	- 48 -
Abb. 11: Abdampfen der Eluate unter einem Stickstoffstrom.....	- 48 -
Abb. 12: Chromatogramm eines Aflatoxin-Mixstandards mit einer Konzentration von 10 ng/ml.....	- 50 -
Abb. 13: Chromatogramm eines AFB ₁ Standard mit 10 (ng/mL).....	- 54 -
Abb. 14: Chromatogramm einer Feigenprobe (gespiked 10 ng/ml AFB ₁)	- 55 -
Abb. 15: Chromatogramm einer FAPAS Feigenprobe (T04150)	- 60 -
Abb. 16: Eichgerade für AFB ₁	- 63 -
Abb. 17: Eichgerade für AFB ₂	- 64 -
Abb. 18: Eichgerade für AFG ₁	- 64 -
Abb. 19: Eichgerade für AFG ₂	- 65 -
Abb. 20: Chromatogramm eine AF-Mix Standard-Lösung (AFB ₁ : 0,893 ng/mL AFB ₂ : 0,304 ng/mL, AFG ₁ : 1,046 ng/mL, AFG ₂ : 0,334 ng/mL)	- 68 -
Abb. 21: Chromatogramm einer positiven Pistazienprobe (E_100713)	- 68 -
Abb. 22: Chromatogramm einer positiven Pistazienprobe AFG ₁ und AFB ₁ (E_100790).....	- 70 -
Abb. 23: Chromatogramm eine AF-Mix Standard-Lösung (AFB ₁ : 0,446 ng/mL AFB ₂ : 0,152 ng/mL, AFG ₁ : 0,523 ng/mL, AFG ₂ : 0,167ng/mL)	- 70 -
Abb. 24: Pistazienprobe E_100724.....	- 71 -
Abb. 25: Pistazienprobe E_100701.....	- 72 -

Abb. 26: Chromatogramm einer Dattelprobe	- 73 -
Abb. 27: Chromatogramm einer Aprikose	- 74 -
Abb. 28: Chromatogramm einer aflatoxinfreien Maulbeerprobe	- 74 -
Abb. 29: Chromatogramm einer Babyfeigenprobe	- 75 -
Abb. 30: Chromatogramm einer negativen Erdnussprobe	- 75 -
Abb. 31: Chromatogramm einer Mandelprobe	- 76 -
Abb. 32: Chromatogramm einer Pink Nut Probe	- 76 -
Abb. 33: Chromatogramm einer negativen Sultaninenprobe	- 77 -

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Meldungen des RASFF für Aflatoxin in Lebensmitteln im Zeitraum eines Jahres (01/09/09 und 01/09/10, [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=search-ResultList], Zugriff am 11.09.2010)	- 2 -
Tab. 2: Wichtige Mykotoxine auf Lebensmitteln [modifiziert nach WEISS, 2010 und KÜCK et al., 2009].....	- 5 -
Tab. 3:: Höchstwerte für AFs in verschiedenen Lebensmitteln und Erzeugnissen [EUROPÄISCHE KOMMISSION 2010a]	- 17 -
Tab. 4: Auswahl einiger Probenvorbereitungsmethoden	- 33 -
Tab. 5: Übersicht über Anzahl und Herkunft der analysierten Lebensmittelproben.....	- 46 -
Tab. 6: Wiederfindungsraten von AFB ₁ in einer Feigenprobe an 3 aufeinanderfolgenden Tagen.....	- 56 -
Tab. 7: Wiederfindungsraten aller Aflatoxine in einer Referenzprobe nach spiken mit einem Aflatoxin-Mixstandard	- 57 -
Tab. 8: Validierung der Methode mit zertifiziertem Referenzmaterial (FAPAS T04150).....	- 58 -
Tab. 9: Wiederfindungsraten von Aflatoxinen in Pistazienprobe mit zertifiziertem Aflatoxin-Mix-Standard (AFB ₁ : 0,893 µg/ml, AFB ₂ : 0,304 µg/ml, AFG ₁ : 1,046 µg/ml, AFG ₂ : 0,334 µg/ml)	- 61 -
Tab. 10: Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen der einzelnen Aflatoxine	- 66 -
Tab. 11: Positive LM-Proben unter der Quantifizierungsgrenze	- 67 -
Tab. 12: Positive Lebensmittelproben über die QG	- 69 -

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AFT	Aflatoxin
AFB1	Aflatoxin B1
AFB2	Aflatoxin B2
AFG1	Aflatoxin G1
AFG2	Aflatoxin G2
AFM1	Aflatoxin M1
AFM2	Aflatoxin M2
AFs	Aflatoxine
bzw.	beziehungsweise
DC	Dünnschichtchromatographie
DON	Deoxynivalenol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IAC	Immunaффinitätschromatographie
KBr	Kaliumbromid
LC-MS	Liquid Chromatography- Massen Spektrometrie
LLE	Liquid-Liquid-Extraction
LM	Lebensmittel
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
MSDP	Matrix Festphase Dispersion
n. d.	nicht detektierbar
NG	Nachweisgrenze
OTA	Ochratoxin A
PBPB	Pyridiniumbromidperbromid
PBS	Phosphat Buffered Saline
QG	Quantifizierungsgrenze

SPE	Solid Phase Extraction
SPM	Solid Phase Microextraction
TFA	Trifluoressigsäure
WL	Waschlösung

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis	iii
Abkürzungen.....	iv
1 Einleitung und Fragestellung.....	- 1 -
2 Vorkommen von Mykotoxinen in Lebensmitteln	- 3 -
3 Mykotoxine	- 4 -
3.1.1 Wasseraktivität	- 6 -
3.1.2 Temperatur.....	- 6 -
3.1.3 pH-Wert	- 6 -
3.1.4 Sauerstoffkonzentration.....	- 7 -
3.2 Möglichkeiten der Lebensmittelkontamination	- 7 -
3.2.1 Primärkontamination.....	- 7 -
3.2.2 Sekundärkontamination.....	- 7 -
3.2.3 Carry-over	- 8 -
3.3 Mykotoxin bildender Schimmelpilze, die in Trockenfrüchten und Nüssen vorkommen.....	- 8 -
3.3.1 Feldpilze	- 9 -
3.3.2 Durch Lagerpilze produzierte Mykotoxine	- 9 -
3.4 Aflatoxine.....	- 12 -
3.4.1 Vorkommen in Lebensmitteln	- 13 -
3.4.2 Resorption und Stoffwechsel.....	- 14 -
3.4.3 Toxische Wirkungen	- 14 -
3.4.4 Gesetzliche Regelungen	- 16 -
4 Methoden der Mykotoxinanalyse.....	- 20 -
4.1 Screeningmethoden.....	- 20 -
4.2 Chromatographische Methoden in der Mykotoxinanalyse	- 22 -
5 HPLC.....	- 25 -
5.1 Der Trennprozess.....	- 25 -
5.2 Peakverbreiterung	- 26 -
5.3 Aufbau	- 27 -
6 Methoden der Probenvorbereitung für die Bestimmung der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 in LM	- 30 -
6.1 Extraktionstechniken.....	- 31 -
6.2 Clean-up.....	- 35 -
6.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid-Extraction = LLE) ...	- 35 -
6.2.2 Festphasen-Extraktion.....	- 36 -
6.2.3 Immunaффinitätschromatographie (IAC)	- 38 -
7 Material und Methoden.....	- 40 -
7.1 Reagenzien und Referenzproben.....	- 40 -
7.2 Sonstige Gegenstände	- 40 -
7.3 Geräte.....	- 41 -
7.4 Methoden.....	- 42 -
7.4.1 Probenahme und Homogenisierung	- 42 -
7.4.2 Extraktion	- 43 -
7.4.3 Clean-up.....	- 47 -
7.4.4 Quantifizierung mittels HPLC	- 48 -

7.4.5	Berechnung der Probenkonzentration	- 49 -
7.4.6	Herstellung von Aflatoxin-Mixstandard-Lösungen	- 49 -
7.4.7	Wiederfindung an Testmaterial (Feigen-Slurry von Fapas)	- 50 -
7.4.8	Standardaddition: Bestimmung der Wiederfindung von AFB1 mit AFLA-Kit-Mix, Spiken des Eluates (Blankprobe)	- 51 -
8	Ergebnisse und Diskussion	- 52 -
8.1	Optimierung der Probenvorbereitung in der Analyse von Trockenfrüchten und Nüssen.....	- 52 -
8.1.1	Extraktion	- 52 -
8.2	Validierung der Methode und Bestimmung der Wiederfindung.....	- 53 -
8.2.1	Bestimmung der Wiederfindung (Spiken des Ektraktes)	- 53 -
8.2.2	Reproduzierbarkeit der Methode: Bestimmung der Wiederfindungsrate von Aflatoxinen in Feigenprobe an 3 aufeinanderfolgenden Tagen.....	- 54 -
8.2.3	Wiederfindung von AFT in Feigenslurry	- 56 -
8.2.4	Bestimmung der Wiederfindungsraten mittels zertifiziertem Referenzmaterial von FAPAS (Feigen, T04150)	- 57 -
8.2.5	Bestimmung der Wiederfindung von Aflatoxinen in Pistazien.	- 61 -
8.3	Kalibration mittels Standardgerade.....	- 63 -
8.4	Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen	- 65 -
8.5	Bestimmung von Lebensmittelproben.....	- 67 -
8.5.1	Lebensmittelproben mit AF-Konzentrationen unter der Quantifizierungsgrenze	- 67 -
8.5.2	Lebensmittelproben mit AF-Konzentratioen über der Quantifizierungsgrenze	- 69 -
8.5.3	Lebensmittelproben mit Aflatoxinkonzentrationen über den gesetzlich erlaubten Höchstwerten.....	- 71 -
8.5.4	Lebensmittelproben in denen keine Aflatoxine nachgewiesen werden konnten.....	- 73 -
9	Schlussbetrachtung.....	- 79 -
10	Zusammenfassung.....	- 80 -
11	Summary.....	- 81 -
12	Literaturverzeichnis	- 82 -
13	Lebenslauf	- 86 -

1 Einleitung und Fragestellung

Laut österreichischem Ernährungsbericht 2008 wurden in Österreich zwischen 2003-2007 2.357 Lebensmittelproben (davon 164 auf Patulin, 870 Proben auf Ochratoxin A, 187 Proben auf Aflatoxin M₁ und 1.136 Proben auf die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂) auf Mykotoxingehalte untersucht, wobei 19 % der untersuchten Lebensmittel messbare Konzentrationen an Patulin, Ochratoxin A und Aflatoxinen aufweisen konnten. 1,7 % aller Proben enthielten Mengen, die Konzentrationen enthielten, die die gesetzlich festgelegten Höchstwerte überschritten [ELMADFA et al., 2009].

Das Europäische Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF, dessen Aufgabe die Dokumentation der Warnungen vor auffälligen Lebensmitteln und Produktrückrufe von Lebens- und Futtermitteln ist) meldete im Zeitraum eines Jahres (zwischen 01.09.2009 und 01.09.2010) 11 Anzeigen (alert- and information notifications, border rejection notifications) für Getreide und Backwaren, 40 Fälle für Früchte und Gemüse, 71 für Kräuter und Gewürze und 438 Fälle für Nüsse und Nussprodukte.

Der überwiegende Anteil dieser insgesamt 560 Meldungen für Lebensmittel in diesem Zeitraum betraf Nüsse und Nussprodukte wie zum Beispiel Erdnüsse, Pistazien, Mandeln und Kastanien. In Muskatnüssen, in Chilli-, Paprika- und Currypulver wurden sogar Gesamtaflatoxinkonzentrationen von über 100 µg/kg gemessen, wobei die höchste Konzentration in Kräutern und Gewürzen (getrockneter Paprika) aus Peru zu finden waren. Hier konnten Konzentrationen von 216 µg/kg Aflatoxin B₁ sowie 221 µg/kg Gesamtaflatoxin (AFT). Zu den am häufigsten mit Aflatoxinen kontaminierten Trockenfrüchte zählten vor allem Feigen aus der Türkei. Hingegen zu, den mit Aflatoxinen belasteten Cerealien zählte überwiegend Reis-, aus Pakistan [<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=search-ResultList>]. Tab.1 zeigt einen kurzen Überblick der gemeldeten Lebensmitteln und über die Herkunftsländer.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die am österreichischen Markt erhältlichen Nüsse und Trockenfrüchte zu evaluieren.

Tab. 1: Meldungen des RASFF für Aflatoxin in Lebensmitteln im Zeitraum eines Jahres (01/09/09 und 01/09/10, [<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=search-ResultList>], Zugriff am 11.09.2010)

Herkunftsland	Getreide und Backwaren	Früchte und Gemüse	Kräuter und Gewürze	Nüsse, Nussprodukte und Saatgut
Ägypten				5
Algerien				1
Argentinien				99
Australien				5
Bolivien				3
Brasilien				14
China			1	76
Ghana				1
Griechenland		1		
Indien	1	1	54	6
Indonesien			4	1
Iran				67
Italien				4
Kirgisistan				1
Libanon				1
Nicaragua				3
Niederlande			2	
Nigeria		1		10
Pakistan	7		4	
Peru			2	
Senegal		1		
Sierra Leone				1
Spanien			2	1
Sri Lanka	1		1	
Süd Afrika				12
Syrien		1		2
Thailand			1	1
Togo				1
Türkei		35		48
UK	1			
USA	1			73
Vietnam				2
Summe	11	40	71	438

2 Vorkommen von Mykotoxinen in Lebensmitteln

Schimmelpilze sind heterotroph, sie benötigen organische Verbindungen für ihr Wachstum und Entwicklung, wofür tierische und pflanzliche Substrate geeignete Medien sind. Besonders rasch vermehren sie sich in Gegenwart von Glukose, Maltose und Saccharose [MÜCKE u LEMMEN, 2004].

Vor allem in fettreichen pflanzlichen Lebensmitteln werden hohe Aflatoxingehalte nachgewiesen. Aflatoxinproduzierende Pilze sind häufig auf Nüssen (Erdnüsse, Pistazien, Mandeln), Trockenfrüchten (Feigen, Rosinen), Gewürzen sowie auf verschiedenen Getreidesorten (Mais, Baumwollsaaten, Hirse, Weizen) zu finden [WEISS, 2010].

Trockenfrüchte werden vielfältig als Nahrungsmittelergänzung eingesetzt. Sie eignen sich aufgrund der hohen Nährstoffdichte als ernährungsphysiologisch hochwertiger Ersatz für Süßwaren. Nüsse wurden lange Zeit für zu fett gehalten, heute finden sie wegen ihres hohen Anteils an essentiellen Fettsäuren, Mineralstoffen, Ballaststoffen und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in vielen Lebensmittelbe- und -verarbeitungsstufen ihren Einsatz. Trockenfrüchte und Nüsse werden häufig als Lebensmittelzusatz in Müsli, Studentenfutter, in Vital-snacks etc. verwendet.

Einige Trockenfrüchte und Nüsse werden jedoch aus Ländern importiert, wo klimatische Bedingungen die Entstehung und Vermehrung verschiedener Schimmelpilze begünstigen. Durch unsachgemäße Lagerung im tropischen und subtropischen Klima, aber auch durch eine Klimaerwärmung der gemäßigten Zonen kann der Anteil an Toxin-produzierenden Stämmen zunehmen [KÜCK et al., 2009].

3 Mykotoxine

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, sie können bereits in geringen Konzentrationen gesundheitsschädlich auf Mensch und Tier, sowie auf einige höhere Pflanzen wirken. Etwa 30-40 % aller bekannten Pilzarten bilden Mykotoxine [WEISS, 2010]. Einen guten Nährboden für Schimmelpilze bieten Lebensmittel, welche in allen Stufen der Herstellung (von der landwirtschaftlichen Produktion über die Lebensmittelverarbeitung bis zur Lagerung) unsachgemäß behandelt bzw. gelagert werden [WEISS, 2010].

Schimmelpilze bestehen aus einem Vegetationskörper (Mycel), der aus mehr oder weniger verzweigten Fäden (Hypen) besteht. Als Schimmelpilze werden jene Pilze bezeichnet, die auf Lebensmitteln mit einem sichtbaren Mycel wachsen [WEISS, 2010]. Schimmelpilze besitzen durch ihren Sekundärmetabolismus die Fähigkeit in hohem Maße unter anderem Mykotoxine auf Futter- oder Nahrungsmittel zu produzieren, die nach Aufnahme von Mensch oder Tier Vergiftungen, sogenannte Mykotoxikosen, verursachen können [KÜCK et al., 2009]. Zu den wichtigsten Toxinproduzenten gehören unter anderem *Aspergillen*, *Penicillien* und *Fusarien* [WEISS, 2010a]. Einige Mykotoxine und die durch sie belastete Lebensmittel sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Wichtige Mykotoxine auf Lebensmitteln [modifiziert nach WEISS, 2010 und KÜCK et al., 2009]

Mykotoxin	Produzent	Häufige Erkrankungen und Wirkungen	Häufig belastete Lebensmittel
Aflatoxine	<i>A.flavus</i> <i>A.parasiticus</i>	leberschädigend, kanzerogen, mutagen, nephrotoxisch, immuno-toxisch, neurotoxisch	Nüsse, Erdnüsse, Pistazien, Getreide, Haferflocken, Feigen, Gewürze, Mandeln, Marzipan
Ochratoxin A, B, C	<i>A.ochraceus</i> <i>P.verrucosum</i>	nephrotoxisch, immunsuppressiv, evtl. kanzerogen	Getreide, Kaffee, Bier, Wein, Trauben
Patulin	<i>P.expansum</i> <i>P.patulum u.a.</i>	Hämorrhagisch, ödematös, im Tierversuch kanzerogen	Obst, Säfte
Ergotalkaloide	<i>Claviceps purpurea</i>	neurotoxisch, Durchblutungsstörungen	Roggen und andere Getreide
Deoxynivalenol	<i>Fusarium spec.</i>	Nephrotoxisch, immuno-toxisch, gastrointestinaler Reizstoff	Gerste, Hafer, Mais, Roggen, Nudeln, Teigwaren, Brot, Bier
Zearalenon	<i>F.graminearum u.a.</i>	östrogene Wirkung, Infertilität, kanzerogen, neurotoxisch, dermatotoxisch, Schädigung der Blutbildungsorgane	Getreide, Heu, Sesammehl, Mais, Brot, Backwaren, Cornflakes, Walnüsse und carry over in Milch
Trichotecene	<i>F.graminearum</i> <i>F.culmorum u. a.</i>	Haut- und Schleimhautschädigung, Magen-Darm-Störungen, immunsuppressiv	Getreide, Hirse
Fumonisine	<i>F.verticillioides</i> <i>F.proliferatum</i>	Teratogen, vermutlich kanzerogen und mutagen, hepatotoxisch, neurotoxisch	Mais, Cornflakes, Popcorn, Tortilla-Chips
Citrinin	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>	Hepatotoxisch, neurotoxisch, nephrotoxisch, zytotoxisch, kanzerogen, mutagen	Getreide, Toastbrot, Erdnüsse, Schinken, Zitrusfrüchte
Citreoviridin	<i>P.citreoviride</i>	neurotoxisch, Herzstörungen	Reis, Mais, Fleischprodukte
Sterigmato-cystin	<i>A.nidulans</i> , <i>A.versicolor u. a.</i>	Karzinogen, hepatotoxisch, nephrotoxisch	Nüsse, Getreide, Hartkäse, grüne Kaffeebohnen, Reis

Da Schimmelpilze heterotroph sind, dient ihnen organische Nahrung als Kohlenstoffquelle. Sie wachsen in Gegenwart von Glukose, Maltose und Saccharose ideal und können sich deshalb besonders gut auf Nahrungsmitteln ausbreiten, welche zusätzlich die Toxinbildung fördern [MÜCKE und LEMMEN, 2004]. *A. parasiticus* produziert die höchsten Toxinmengen bei Vorhandensein von Glukose, Saccharose und Zink. *A. flavus* besitzt die Fähigkeit AFs zu produzieren, wenn Pepton als Stickstoffquelle dient [KLICH, 2007].

3.1.1 Wasseraktivität

Die Menge an verfügbarem Wasser ist bedeutend für das Pilzwachstum. Für zahlreiche *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten liegt das Optimum der Wasseraktivität, der a_w -Wert bei 0,95-0,98. Die Aflatoxinproduktion von *A. flavus* ist am höchsten bei Wasseraktivitäten über 0,89 [KLICH, 2007]. Als Minimum wird für die meisten Pilzarten ein a_w -Wert von 0,8-0,85 angegeben [KÜCK et al., 2009].

3.1.2 Temperatur

Schimmelpilzwachstum ist in einem sehr weiten Temperaturbereich von ca. 0 °C bis 52 °C möglich, wobei das Temperaturoptimum der mesophilen Schimmelpilze liegen zwischen 15 °C und 40 °C, das der psychophilen (Kälte liebend) Pilze zwischen 0 °C und 17 °C. Thermophile Schimmelpilze haben ein Temperaturminimum von über 20 °C und das Maximum hingegen liegt über 50 °C [KÜCK et al., 2009].

3.1.3 pH-Wert

Leicht saure pH-Werte von 4,5-6,5 werden von den verschiedenen Arten bevorzugt, wobei viele Pilze den pH-Wert ihrer unmittelbaren Umgebung durch die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten beeinflussen können [WEISS, 2010a]. Obwohl das optimale Zellwachstum im eher sauren Milieu erfolgt, ist eine Synthese von Sekundärmetaboliten (wie die von den Mykotoxinen) meist bei einem pH von ca. 8 optimal, was die Stabilität dieser Produkte bewirkt [KÜCK et al., 2009].

3.1.4 Sauerstoffkonzentration

Obwohl Schimmelpilze noch bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck wachsen können, hemmt ein erhöhter CO₂-Gehalt bei gleichzeitig niedriger Sauerstoffkonzentration viele Toxinproduzenten in ihrem Wachstum [MÜCKE und LEMMEN, 2004]

3.2 Möglichkeiten der Lebensmittelkontamination

3.2.1 Primärkontamination

Die Primärkontamination ist nur bei pflanzlichen Lebensmitteln charakteristisch, wobei ein Befall des Lebensmittelrohstoffes am Feld vorliegt.

Dabei wird zwischen Feld- und Lagerpilzen unterschieden. Unter der Bezeichnung Feldpilze sind jene Mykotoxine zu verstehen, die bereits vor der Ernte entstehen (z.B.: Fusarien, die in allen Bodenarten vorkommen können). Lagerpilze können sich ebenfalls vor der Ernte auf der Pflanze befinden, die Toxinproduktion setzt jedoch erst bei unsachgemäßer Lagerung ein (*Penicillium* und *Aspergillus* Arten) [WEISS, 2010a].

3.2.2 Sekundärkontamination

Dabei befallen Schimmelpilze das fertig hergestellte Lebensmittel, sowohl pflanzlichen als auch tierischen Ursprungs. In diesem Fall ist der Befall in der Regel optisch erkennbar, die durch Konidienbildung verfärbten Pilzkolonien verursachen ein verändertes Aussehen, Geruch und Geschmack des Lebensmittels [KÜCK et al., 2009].

Fallweise werden aber Schimmelpilze in der Lebensmittelherstellung absichtlich eingesetzt (z.B. *P. nalgiovensis* sowie *P. camemberti*, *P. roqueforti*), wodurch manche Rohschinken und Rohwürste oder einige Weichkäse ihr charakteristisches Aroma erhalten [WEISS, 2010a]. Auch Sojasauce wird durch Beimpfung der Schimmelpilzarten *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus sojae* der gekochten Sojabohnen und geröstetem Weizenschrot hergestellt [KÜCK et al., 2009]. Schimmelpilze haben also aus den verschiedensten Gründen eine große Be-

deutung in der Lebensmittelindustrie. Ihr Haupteinsatzgebiet ist die Fermentation, sie können aber auch direkt als Proteinquelle dienen (z.B. QuornTM aus dem Pilz *Fusarium venenatum*) [KÜCK et al., 2009].

3.2.3 Carry-over

Mykotoxine können auch in Lebensmittel tierischen Ursprungs gelangen, indem Nutztiere mit kontaminiertem Futter gefüttert werden und diese Mykotoxine in unveränderter oder in metabolisierter Form in dessen Organen oder Muskelfleisch gespeichert oder in Milch ausgeschieden werden. Der Konsument als Letztverbraucher nimmt auf dem Weg nicht sichtbare metabolisierte Mykotoxine auf. Werden zum Beispiel Kühe mit AFB₁ kontaminiertem Getreide gefüttert, so wird AFB₁ in ihren Organismen zu AFM₁ hydroxyliert und gelangt auf diesem Wege in die Milch.

3.3 Mykotoxin bildender Schimmelpilze, die in Trockenfrüchten und Nüssen vorkommen

Mykotoxine sind mit Molekulargewichten von unter 1500 Dalton relativ kleine Moleküle. Ihre chemischen Strukturen sind vielfältig und umfassen Stoffgruppen wie Pyrone, Anthrachinone, Cumarinderivate, Makrolide, Steroide und zyklische Polypeptide. Sie werden insgesamt 25 Strukturtypen zugeordnet, heute sind etwa 300 chemisch definierte Mykotoxine bekannt [KÜCK et al., 2009]. Mykotoxine lösen keine direkte Immunantwort im Organismus aus, Vergiftungen können deshalb für lange Zeit unentdeckt bleiben. Obwohl Menschen signifikante Mykotoxin-Mengen durch die Inhalation von Sporen aufnehmen können (*A. flavus* oder *Stachybotrys chartarum*), ist eine Bedrohung durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel bedeutsamer. Nach Schätzungen der FAO (Food and Agriculture Organization) der Vereinten Nationen sind etwa 25 % aller weltweit produzierten Lebensmittel mit messbaren Mengen an Mykotoxinen belastet, wobei in etwa 20 % der in der EU hergestellte Getreideernte beachtliche Mengen nachweisbar sind [KÜCK et al., 2009].

3.3.1 Feldpilze

Die größte wirtschaftliche Bedeutung haben Feldpilze der Gattung *Fusarien*, die in allen Bodenarten vorkommen können und sind Bestandteil der natürlichen Mikroflora der obersten Schichten des Bodens. Fusariantoxine sind bedeutende pflanzenpathogene Erreger auf Getreide. Sie sind weit verbreitet, ihre Toxine sind auch in trockenen Jahren und bei einem sehr geringen Befall im Getreide nachweisbar (DON bis ca. 40 µg/kg). Ein drastischer Anstieg ihrer Konzentration kann in feuchten Jahren (DON bis über 1000 µg/kg) sowie weiters durch unsachgemäße Lagerung erfolgen [WEISS, 2010b].

Fusarium-Arten wachsen in einem Temperaturbereich von 1-39 °C, das Optimum liegt bei 25-30 °C. Die maximale Mykotoxinbildung findet in der Regel bei Temperaturen von 8-12 °C statt [KRÄMER J, 2007].

Zu den bedeutendsten Fusariantoxinen gehören die Gruppen der Fumonisine, Trichotecene (A und B) und Zearalenon.

3.3.2 Durch Lagerpilze produzierte Mykotoxine

Citrinin

Das Mykotoxin wird auch als Antimycin genannt und wird häufig mit Ochratoxin A gemeinsam auf einheimischem Getreide (Mais, Reis, Weizen, Gerste, Roggen, Hafer) gefunden. Neben Erdnüsse sind manche der Pilze auch auf Fleisch und Fleischerzeugnissen, aber auch auf Zitrusfrüchten zu finden. Citrinin wird von Ochratoxin A-bildenden Pilzen, weiteren *Penicillien* und *Aspergillen* synthetisiert, es ist zytotoxisch und nierenschädigend [WEISS, 2010b].

Citreoviridin

Das Mykotoxin Citreoviridin wird von *Penicillium citreoviride* und anderen Schimmelpilzen bei relativ niedrigen Temperaturen gebildet. Meist ist es auf Getreidearten wie Reis und Mais, manchmal aber auch auf Fleischprodukten zu finden. Citreoviridin hat eine gelbe Farbe und wurde erstmals aus gelb verfärbtem Reis in Ostasien isoliert.

Citreoviridin hemmt die mitochondriale ATPase, wodurch die Energieversorgung der Zellen unterbrochen wird. Es kommt zu neurotoxischen und kardiotoxischen Wirkungen mit Schädigungen der Niere und Leber. Die Aufnahme hoher Dosen an dieses Toxin kann die kardinale Beri-Beri Krankheit (Störungen des Herz-Kreislaufsystems, die sich zu Beginn in starkem Herzklopfen bzw. einer Pulsbeschleunigung äußert) aber auch eine Paralyse des Nervensystems (vollständige Lähmung) und Tod durch Atemlähmung hervorrufen [WEISS, 2010b].

Ochratoxin A

Ochratoxine werden von Pilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet. Das Toxin ist nach *Aspergillus ochraceus* benannt. Ochratoxin A (OTA) hat von allen Ochratoxinen die stärkste toxische Wirkung, weshalb sich die Untersuchungen auf dieses Toxin beschränken. Ochratoxin A wird auch auf heimischen Erzeugnissen gefunden (besonders auf gelagertem Getreide). Häufig belastete Lebensmittel sind Bier, Wein, Trauben(saft), Rosinen sowie Kaffee, Tee und Kakao. Aber auch Fleisch und Fleischerzeugnissen, insbesondere Innereien kann durch die Metabolisierung aus dem Futtermittel OTA nachgewiesen werden. OTA ist in erster Linie nephrotoxisch, wirkt aber auch hepatotoxisch, kanzerogen und immunsuppressiv, im Tierversuch außerdem embryotoxisch und teratogen [WEISS, 2010a].

Patulin

Patulin ist sowohl ein Lager- als auch ein Feldpilz. Das meist auf pflanzlichen Substraten wie Obst, Gemüse und Getreide wachsende Toxin wird unter anderem von *Penicillium expansum* gebildet und ist ein weit verbreiteter Lagerpilz. Patulin befindet sich vor allem in braunfaulem Obst und wird in Obstsäften, Konfitüren und Kompotts gefunden. Das Toxin ist hitzestabil und wird aber durch alkoholische Gärung abgebaut. Es ist ein breit wirksames Zellgift, nach oraler Aufnahme kommt es zu Schleimhautreizungen im Magen-Darm-Trakt, zu Übelkeit und Erbrechen, sowie zu Durchfällen. Es ist weder kanzerogen noch

teratogen, im Vergleich zu Aflatoxinen ist das lebensmitteltoxikologische Risiko deutlich geringer [WEISS, 2010a].

Sterigmatocystin

Dieses Mykotoxin ist ein Zwischenprodukt der Aflatoxinbiosynthese, gebildet von *Aspergillen* (z. B.: *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus bipolaris*) und weist daher eine aflatoxinähnliche Struktur auf. Auch der Wirkungsmechanismus entspricht weitgehend dem der Aflatoxine, jedoch besitzt es eine deutlich geringere toxische Wirkung. Sterigmatocystin wird meistens in Produkten gefunden, die aus stark verschimmelten Rohstoffen stammen, ist aber gelegentlich auch auf Käse zu finden [WEISS, 2010b].

Alternaria-Toxine

Die etwa 300 Alternaria-Arten, die bisher bekannt sind, werden auch Schwärzepilze genannt. Sie gelten als weit verbreitete Materialzerstörer und Lebensmittelverderber und befallen als Feld- und Lagerpilze Getreidearten wie Hirse, Weizen und Roggen, aber auch Gemüse und Obst, Nüsse, Tabak und Gewürze. *Alternaria alternata* und *A. tenuissima* bilden schwarze Faulstellen auf Obst und Gemüse, *Alternaria citri* besiedelt Zitrusfrüchte auf dem Baum. Der Befall von Kartoffelblättern sowie der Knolle bei der Ernte „Hartfäule“ wird von *Alternaria solani* hervorgerufen [WEISS, 2010b].

Je nach Art werden unterschiedliche Toxine produziert, wobei mehr als 30 verschiedene Substanzen bekannt sind. Akute Vergiftungen führen im Tierversuch zu Diarrhöe, Erbrechen und gastrointestinalen Blutungen sowie Krämpfen und Muskelzittern. Die Pilzgifte wirken zytotoxisch, schwach mutagen sowie im Tierversuch teratogen und kanzerogen. Einige Alternaria-Toxine blockieren die Ceramid-Synthase, wirken allergisierend und werden in Zusammenhang mit Speiseröhrentumoren gebracht [WEISS, 2010b].

3.4 Aflatoxine

Aflatoxine (AF) sind sekundäre Stoffwechselprodukte von hepatotoxischen Lagerpilzen. „Gemäß JECFA (1998) zählen Aflatoxine zu den wirksamsten bekannten mutagenen und karzinogenen Substanzen, wobei Aflatoxin B₁ die giftigste davon ist“ [ELMADFA I et al., 2009].

Verantwortlich für die mutagene und kanzerogene Wirkung der Substanzen sind hochreaktive 8,9-Epoxide (entstanden durch Oxidation der Doppelbindung im äußeren Furanring von Aflatoxin B₁, G₁ und M₁), die Nukleinsäuren am N⁷-Guanin alkylieren [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

AFs werden hauptsächlich von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildet. Die Arten unterscheiden sich dabei durch die Produktion der Toxine. Während *A. flavus* nur AFB₁ und AFB₂ synthetisiert, produziert *A. parasiticus* alle AFs. Die wichtigsten Vertreter sind die Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ und M₂. Ihr Name beruht auf der Eigenschaft der Toxine, unter langwelligem (bei 350 nm) UV-Licht blau (B₁ und B₂) bzw. grün (G₁ und G₂) zu fluoreszieren. Die Aflatoxine M₁ und M₂ sind nach ihrem Vorkommen in Milch benannt. Sie sind Hydroxyderivate von B₁ und B₂ vorkommend in Milch und Urin von laktierenden Haustieren und von Menschen [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Erstmals erwähnt wurden die Aflatoxine 1960, wobei ein Massensterben etwa 100.000 Truthähne sowie 20.000 Enten und Wachteln an einer bis dahin unbekannten Krankheit (turkey-X-disease) verendeten. Das verfütterte Erdnussmehl aus Brasilien war mit dem Schimmelpilz *Aspergillus flavus* befallen [KÜCK et al., 2009]. Am giftigsten und mengenmäßig am häufigsten in Lebensmittel enthaltenen ist AFB₁, welches vor allem lebertoxisch wirkt. Abb. 1 zeigt die Strukturformeln von AFB₁ und AFB₂, Abb. 2 die der AFG₁ und AFG₂ und Abb. 3 zeigt die Struktur von AFM₁ und AFM₂.

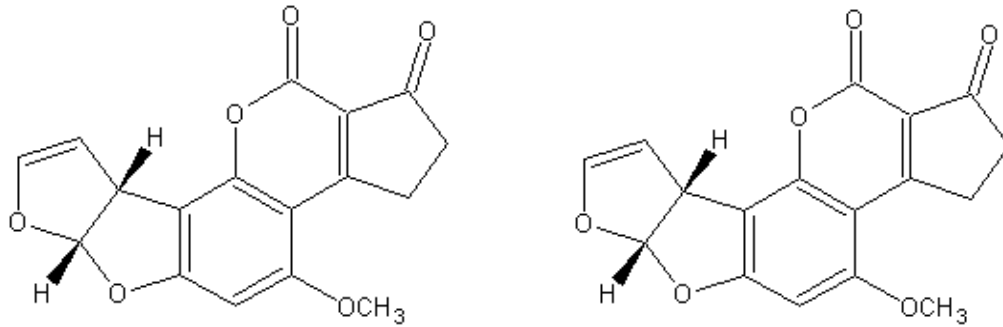


Abb. 1: Strukturformel von AFB₁ und AFB₂

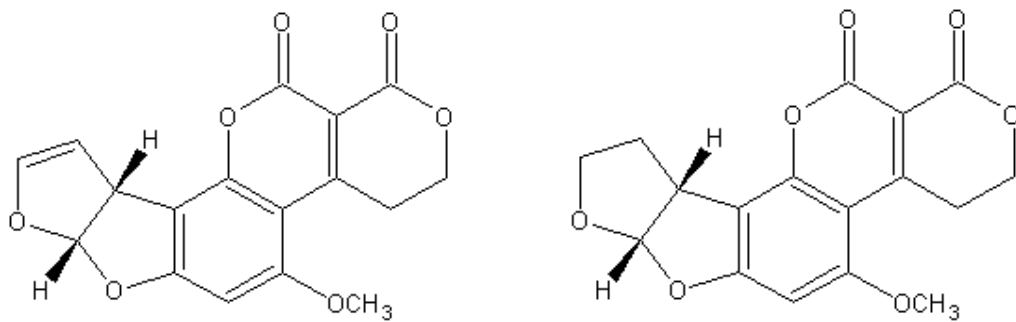


Abb. 2: Strukturformel von AFG₁ und AFG₂

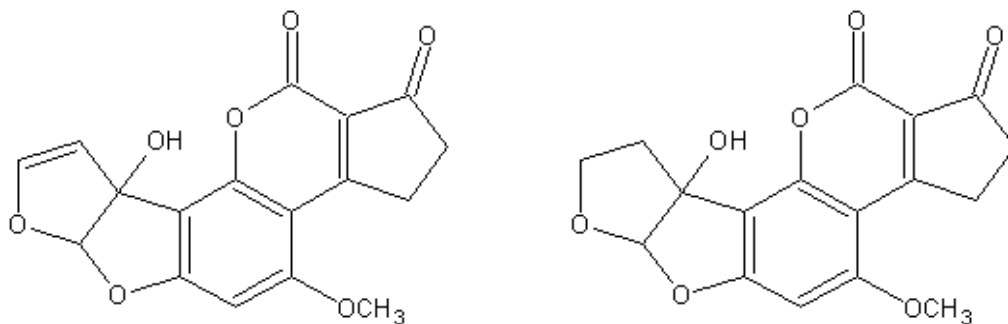


Abb. 3: Strukturformel von AFM₁ und AFM₂

3.4.1 Vorkommen in Lebensmitteln

Hohe AF-Konzentrationen werden vor allem in fettreichen pflanzlichen Lebensmitteln (Erdnüsse, Pistazien, Mandeln, Haselnüsse, etc...) sowie in manchen Trockenfrüchten (Feigen, Datteln) und in bestimmten Getreidearten (Mais, Hirse, Weizen, Reis) gefunden [MÜCKE und LEMMEN, 2004]. Weiters kommen sie in Gewürzen, Marzipan, ölhaltigen Samen, Olivenöl, Kaffee, Koriander, Orangensaft und in Käse vor [KÜCK et al., 2009].

Feuchte Lagerung des Ernteguts und Temperaturen zwischen 20 und 35 °C begünstigen die Toxinbildung. Lebensmittel aus feucht-warmen Klimazonen sind besonders anfällig [WEISS, 2010a].

Sowohl tierische Milch, als auch Muttermilch kann AFs aus der Nahrung enthalten. Kühe scheiden etwa 0,3-1 % der aufgenommenen Aflatoxine in die Milch aus [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Zwischen 2001 und 2006 wurden in 20 europäischen Ländern AF-Gehalte in Lebensmitteln ermittelt, wobei in 74 % der insgesamt 34.326 Proben die AF-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze (im Durchschnitt 0,1-0,2 µg/kg) lag. Die höchsten Werte wurden in Pistazien (2625 µg/kg), Paranüssen (1897 µg/kg) und in Erdnüssen (985 µg/kg) ermittelt [WEISS, 2010a].

3.4.2 Resorption und Stoffwechsel

AFs werden im allgemeinen oral über die Nahrung aufgenommen, im Magen-Darm-Trakt schnell resorbiert und aus der Blutbahn in Hepatozyten und Zellen anderer Organe aufgenommen. Des weiteren können AFs auch inhalativ, durch toxinbelastete Stäube oder durch Kontakt mit der Haut aufgenommen werden.

Rund 5 % der AFB₁ werden unverändert ausgeschieden, der restliche Teil wird vollständig verstoffwechselt [NAU et al., 2003].

Die Aflatoxine B₁, G₁, M₁ können durch Oxidation am äußeren Furanring in reaktive 8,9-Epoxide umgewandelt werden. Hauptorgan der Epoxidierung ist der Leber, wobei die Reaktion auch noch in der Niere, Lunge und Dickdarm stattfinden kann. Hier entfalten sie ihre kanzerogene und mutagene Wirkung. Die Toxizität der AFs nimmt in folgender Reihenfolge ab: B₁ > G₁ > B₂ > G₂ [WEISS, 2010a].

3.4.3 Toxische Wirkungen

Akute Toxizität

Die akute Vergiftung mit AFB₁ führt zur Leberschädigung mit Nekrosen im Leberparenchym und akutem Leberversagen. Charakteristisch ist auch eine Proliferation des Gallengangepithels. Es kann zur Blutungen (Hämorrhagien) der

Nieren und des Verdauungstraktes sowie zu Störungen des Nervensystems kommen. Die letale Dosis für Erwachsenen wird mit 1-10 mg/kg Körpergewicht angegeben [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Chronische Toxizität

Leberzirrhose und Lebertumore sind typische Folgen einer dauerhaften Zufuhr, wobei Kinder besonders empfindlich reagieren; schon ab täglichen Mengen von 9-18 µg AFs/kg Körpergewicht (KG) können bei Kindern Veränderungen der Leber auftreten. Die akut tödliche Dosis für Erwachsenen wird auf 1-10 mg/kg KG geschätzt [WEISS, 2010a]. AFs werden ebenfalls als Ursache für das sogenannte Reye-Syndrom diskutiert, das gehäuft bei thailändischen Kindern auftritt und sich in einer Enzephalopathie und fettigen Degenerationen der Leber äußert. Im Tierversuch bei Ratten führten bereits einmalige Gaben von 10 µg AFB₁ pro kg Körpergewicht zu Leberkarzinomen [WEISS, 2010a].

Weiters besteht eine synergetische Wirkung von Aflatoxinen und Hepatitis-B-Erkrankung bei der Entstehung solcher Karzinome. Beide Faktoren sind unabhängig voneinander. Das kanzerogene Potential von AFB₁ ist bei Trägern des Hepatitis-B-Virus 20 bis 30 mal so hoch wie bei Hepatitis-B-negativen Personen [WEISS, 2010a]. In Europa konnte bisher kein Zusammenhang zwischen der Ausbildung eines primären Leberkarzinoms und einer Aflatoxinexposition nachgewiesen werden, in den südlichen Regionen Afrikas und in Südostasien wird jedoch die Hälfte der hepatozellulären Karzinome auf diesen Zusammenhang zurückgeführt [MÜCKE und LEMMEN, 2004]. Die hohen Aflatoxinbelastung von Lebensmittel in diesen Ländern werden darauf zurückgeführt, dass 90 % der *Aspergillus flavus* und *A. Parasiticus*-Isolate dort Toxinbildner sind [KÜCK et al., 2009].

Des weiteren konnten im Blutserum und Organen von Kleinkindern in tropischer und subtropischer Ländern, die an Kwashiorkor erkrankt waren, bis zu zehnfach erhöhte Konzentrationen für AFs, sowie für dessen Metabolit Aflatoxicol nachgewiesen werden [REISS, 1988].

3.4.4 Gesetzliche Regelungen

Höchstmengen für Aflatoxine in Lebensmitteln sind in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 festgelegt, welche für alle Mitgliedsstaaten und für sämtliche in die EU eingeführten Produkte gleich gelten. Auch Aflatoxinhöchstgehalte wurden durch die Verordnung (EU) Nr. 165/2010 im EU-Amtsblatt zur Änderung der EG-Kontaminantenverordnung (EG) Nr. 1881/2006 ergänzt. Damit wurden die Höchstwerte für AFs, z.B. in Mandeln, Pistazien, Aprikosenkernen, Haselnüssen und Paranüssen, von 4 – auf 8 -15 µg/kg angepasst. Ölsaaten und daraus gewonnene Erzeugnisse wurden aufgenommen, sowie Erdnüsse und andere Ölsaaten für die Erzeugung von Ölen ausgenommen. Diese Verordnung gilt seit 9. März 2010 [EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2010a].

Die Verordnung (EU) 178/2010 für die Probennahme ergänzt die Verordnung (EG) 401/2006 um Anforderungen für Erdnüsse, sonstige Ölsaaten, Nüsse, Aprikosenkerne, Süssholz sowie pflanzliches Öl [EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2010b].

Die in der Verordnung 165/2010 der Europäischen Union festgelegten Höchstgehalte für Aflatoxine in Lebensmitteln sind in Tab. 3 aufgelistet [EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2010a].

.

Tab. 3:: Höchstwerte für AFs in verschiedenen Lebensmitteln und -Erzeugnissen [EUROPÄISCHE KOMMISSION 2010a]

Erzeugnis	Höchstgehalt für Aflatoxine (µg/kg)		
	B ₁	Summe aus B ₁ , G ₁ , B ₂ , G ₂	M ₁
Erdnüsse und andere Ölsaaten, die vor ihrem Verzehr oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden sollen außer — Erdnüsse und andere Ölsaaten, die zum Zermahlen für die Erzeugung von raffiniertem Pflanzenöl bestimmt sind	8	15	-
Mandeln, Pistazien und Aprikosenkerne, die vor ihrem Verzehr oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden sollen	12	15	-
Haselnüsse und Paranüsse, die vor ihrem Verzehr oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden sollen	8	15	-
Andere Schalenfrüchte als die bisher aufgeführten Schalenfrüchte, die vor ihrem Verzehr oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden sollen	5	10	-
Erdnüsse und andere Ölsaaten und deren Verarbeitungserzeugnisse, die zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt sind außer — pflanzliche Rohöle, die zum Raffinieren bestimmt sind — raffinierte Pflanzenöle	2	4	-

Tab. 3: fortlaufend

Erzeugnis	Höchstgehalt für Aflatoxine (µg/kg)		
	B ₁	Summe aus B ₁ , G ₁ , B ₂ , G ₂	M ₁
Mandeln, Pistazien und Aprikosenkerne, die zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt sind	8	10	-
Haselnüsse und Paranüsse, die zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt sind	5	10	-
Andere Schalenfrüchte als die bisheraufgeführten Schalenfrüchte und deren Verarbeitungserzeugnisse, die zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt sind	2	4	-
Trockenfrüchte, die vor ihrem Verzehr oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden sollen	5	10	-
Trockenfrüchte und deren Verarbeitungserzeugnisse, die zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt sind	2	4	-
Getreide und Getreideerzeugnisse, einschließlich verarbeiteter Getreideerzeugnisse, außer die bisher aufgeführten Erzeugnisse	2	4	-

Tab. 3: fortlaufend

Erzeugnis	Höchstgehalt für Aflatoxine (µg/kg)		
	B1	Summe aus B1, G1, B2, G2	M1
Mais und Reis, der vor seinem Verzehr oder seiner Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden soll	5	10	-
Rohmilch (6), wärmebehandelte Milch und Werkmilch	-	-	0,05
Folgende Gewürzsorten:			
— <i>Capsicum</i> spp. (getrocknete Früchte, ganz oder gemahlen, einschließlich Chili, Chilipulver, Cayennepfeffer und Paprika)			
— <i>Piper</i> spp. (Früchte, einschließlich weißer und schwarzer Pfeffer)			
— <i>Myristica fragrans</i> (Muskat)	5	10	-
— <i>Zingiber officinale</i> (Ingwer)			
— <i>Curcuma longa</i> (Gelbwurz)			
Gewürzmischungen, die eine oder mehrere der oben genannten Gewürzsorten enthalten			
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0,1	-	-
Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung, auch Säuglingsmilchnahrung und Folgemilch	-	-	0,025
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	0,1	-	0,025

4 Methoden der Mykotoxinanalyse

Zum Schutz der Bevölkerung, zur Einhaltung der gesetzlichen festgelegten Höchstwerte in Lebens- und Futtermitteln, insbesondere bei der Einfuhr aus Drittstaaten, werden amtliche Kontrollen mit standardisierten Probenahmeverfahren durchgeführt [KÜCK et al., 2009]. Für die Rohstoffkontrolle ist die rasche Überprüfung der Mykotoxinkonzentration zur Identifizierung von Lebensmitteln mit hohen Belastungen wichtig. Hierzu werden insbesondere Schnellverfahren, sogenannte „Screeningmethoden“ angewandt. Sie sind relativ kostengünstig, im Vergleich einfach und mit geringem Zeitaufwand durchführbar. Die Ergebnisse von Screeningverfahren müssen jedoch durch instrumentelle Verfahren bestätigt werden.

4.1 Screeningmethoden

Die bekanntesten, auf Antikörper-Antigen-Reaktion basierenden Schnellnachweisverfahren zu Mykotoxinanalyse sind ELISA und Lateral-Flow Dipsticks (LFD, Teststreifen).

ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion, wobei die spezifische Bindung der Antikörper-Antigen-Komplex ausgenutzt wird. Antikörper oder Antigene werden mit einem Enzym markiert, der Amplifikator ist die, durch das Enzym katalysierte Chromogenumwandlung. Generell werden drei Systeme unterschieden, das kompetitive ELISA, das zweite System ist das nicht-kompetitive ELISA, das dritte ist der Sandwich-ELISA, der die Quantifizierung in komplexen Mischungen in niedriger Konzentration vorliegenden Antigene dient [LOTTSPREICH F, 2009]. ELISA wird neben qualitativen auch für quantitative Nachweise verwendet, wofür keine Probenvorbereitung erforderlich ist. Hier ist eine in der Durchführung relativ einfache, parallele Bestimmung vieler Proben möglich. Nachteile des ELISA sind, dass durch Matrixinterferenzen falsch positive Ergebnisse erzielt werden können. Die Detektion erfolgt photometrisch, wobei Bestimmungsgrenzen zwischen 0,5 und 50 ng/g

für Aflatoxine, Ochratoxin A, Fumonisine, Deoxynivalenol, Zearalenon und T-2 erreicht werden konnten. Ein weiterer Vorteil von nicht kompetitiven ELISA-basierten Tests sind die niedrigen LODs, welche mit denen der HPLC vergleichbar sind. Die Bestimmungsgrenzen sind allerdings Test-Kit-spezifisch [BISELLI, 2006]. Kolosova et al. verwendete monoklonale Antikörper in der AFB₁-Analyse im direkt kompetitiven ELISA. Gefundene Konzentrationen reichten von 0,1 bis 10 ng/g [KOLOSOVA et al., 2006]. Die mit Standards versetzten Proben zeigten Wiederfindungsraten von 94 bis 113 % mit einem LOD von 0,05 ng/g [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009].

Lateral-Flow Dipsticks

Lateral Flow Teststreifen sind Immunoassay-Nachweismethoden, basierend auf der Bildung von Ag-Ak-Komplexen. In lateralen Flow-Tests wird die Probe auf ein Pad aufgetragen, wo die mit Goldpartikel- markierten Antikörper an Mykotoxine binden. Der Mykotoxin-Antikörper-Goldpartikel-Komplex bindet in der Testregion an ein Aflatoxin-Protein-Konjugat, ungebundene Antikörper-Gold-Komplex binden in der Kontrolle Zone an einen zweiten Antikörper. Falls die Aflatoxinkonzentration der Probe gleich oder größer ist als die cut-off level, verfärbt sich die Testregion. In der Kontrollzone erscheint eine Linie (auch in Abwesenheit von Aflatoxinen), da bei einem funktionierenden Test immer eine Bindung zwischen Goldpartikel und dem zweiten Antikörper zustande kommt [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009].

Screening-Ergebnisse lassen sich in kurzer Zeit erzielen (3-5 Minuten). Vorteile des Lateral-Flow-Systems sind die mobile Einsatzmöglichkeit und eine einfache Durchführung. Die visuelle Bestimmungsgrenze für die Toxine AFB₁ und Deoxynivalenol liegt bei 2- bis 500 ng/g [BISELLI, 2006].

Nach einem positiven Schnelltest ist immer eine genauere Analyse mittels einer instrumentellen Methode zu empfehlen.

4.2 Chromatographische Methoden in der Mykotoxinanalyse

Je nach chemischer Struktur des gesuchten Toxins werden verschiedene Trennverfahren und Detektoren eingesetzt. Die am häufigsten verwendeten Kombinationen von Trennverfahren und Detektoren sind HPLC-UV, HPLC-FLD, GC-ECD und GC-MS [BISELLI, 2006].

Dünnschichtchromatographie (DC)

Das Prinzip der Dünnschichtchromatographie (wie auch das der anderen chromatographischen Methoden) ist die Teilchenverteilung zwischen zwei Phasen. Bei der DC wandert ein Lösungsmittel, durch Kapillarkräfte an einem festen, feinporigen Trägermaterial (z.B. Kieselgel) empor, wobei es zu Adsorptionswechselwirkungen der einzelnen Substanzen mit dem Trägermaterial kommt. Das Trennergebnis ist von der Polarität des Lösungsmittels abhängig [Skoog und Leary, 1996].

Eine Möglichkeit für die Analyse der AFs (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) in verschiedenen Lebensmittelmatrixen wie Mais, Paprika, Nüsse, Erdnüsse und Pistazien, ist eine DC. Dabei erfolgt die Identifizierung und Quantifizierung der getrennten Aflatoxine durch ihren Vergleich mit Aflatoxin-Standards. Die Auswertung erfolgt meist mittels Densitometrie [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009]. Methoden basierend auf der DC sind meist dazu geeignet, die in der Europäischen Union festgelegten Höchstgehalte zu erkennen. Obwohl mittels DC sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Analyse durchführbar ist und keine kostenintensiven Instrumente benötigt werden, wird Dünnschichtchromatographie heutzutage durch LC/MS und HPLC ersetzt [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009].

HPLC-FLD

Die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung von AFs in Lebens- und Futtermitteln ist HPLC (High Performance Liquid Chromatography) mit Fluoreszenz-gekoppelten Detektion. Allerdings besitzen AFB_1 und AFG_1 aufgrund ihrer chemischen Struktur nur eine geringe Eigenfluoreszenz [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009]. Daher werden zur Signalverstärkung verschiedene Techniken der Vor- und Nachsäulenderivatisierung verwendet. AFs können entweder mit

Trifluoressigsäure (TFA), Jod oder Brom derivatisiert werden. Im Vorsäulenderivatisierungsschritt mit TFA werden AFB₁ und AFG₁ aufgrund einer sauren Hydrolyse in ihre hochfluoreszierende Halbacetale AFB_{2a} und AFG_{2a} umgewandelt. Nachteil dieser Methode ist eine etwa 30 min dauernde Reaktionszeit (bei 50 °C). Jodierung und Bromierung sind Nachsäulenderivatisierungsschritte [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009].

In der elektrochemischen Zelle wird das in der mobilen Phase befindliche IBr oder KBr zur elementaren Jod und Brom oxidiert. Jod oder Brom bindet an die 8,9-Doppelbindungen der Aflatoxine und führt zur Verstärkung der Fluoreszenz [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009].

Eine weitere Strategie zur Verstärkung der Fluoreszenz der AFG₁ und AFB₁ ist die Verwendung von Pyridinium-Bromid-Perbromid (PBPB). In dieser Methode ist die mobile Phase nach der Säule mit PBPB angereichert, was die Detektion einer Fluoreszenzreaktion ermöglicht. Dabei werden teilweise höhere Signale erreicht, als bei der Verwendung von Trifluoressigsäure.

Eine weitere Methode für die Signalverstärkung ist die Verwendung von Cyclodextrin, welche der mobilen Phase zugesetzt werden. Cyclodextrine sind verantwortlich für die Bildung von Einschlusskomplexe wo AFs sich einlagern können. Die Signalverstärkung wird als Folge der Wechselwirkungen zwischen Cyclodextrine und AFs oder einer möglichen Wechselwirkung zwischen Wasser und AFs bei Vorhandensein von Cyclodextrinen. Eine Zunahme der Fluoreszenz wird bei Aflatoxinen mit ungesättigten Furan-Ringen (B₁ und G₁) leichter erkannt [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009].

LC-MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)

Die Flüssigchromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion gewinnt immer mehr an Bedeutung in der Untersuchung von Mykotoxinen. Der größte Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit einer Multitoxinanalyse, wo mehrere Mykotoxine innerhalb eines Analysengangs bestimmt werden können [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009]. Die LC-MS ist an verschiedenen Ionisati-

onstechniken gekoppelt wie beispielsweise ESI (Electrospray Ionisation), APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) und APPI (Atmosphärendruck Photoionisation) [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009]. Vorteile der LC-MS-Technik sind hohe Selektivität aufgrund der eindeutigen Analyt-Identifizierung. Durch das Fehlen einer hochentwickelten und anspruchsvollen Probenvorbereitungsmethode kann es jedoch infolge einer Ionen-Unterdrückung zu Matrixidentifizierungsproblemen kommen. Um eine gute Genauigkeit und Präzision der Methode zu erlangen, müssen Matrixstörungen entfernt werden [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009]. Hinsichtlich der Verifizierung und des quantitativen Nachweises ist die LC-MS/MS zunehmend die Methode der Wahl [BISELLI, 2006].

5 HPLC

HPLC (High Performance Liquid Chromatography oder Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) wird sowohl für qualitative als auch für quantitative Analysen verwendet, wobei die Auftrennung eines Substanzgemisches in die einzelnen Komponente erfolgt. Die Trennung an der Trennsäule erfolgt aufgrund von Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Molekülen unterschiedlicher Polarität mit der stationären Phase [GEY, 2008].

Die Flüssigchromatographie (LC) gehört zu den wichtigsten und leistungsfähigsten Trennmethoden, welche durch die Entwicklung der HPLC vor ca. 40 Jahren revolutioniert wurde. Dabei wurden Trennsystem und -materialien miniaturisiert und optimiert. Es war die Entwicklung monodisperser und sehr kleiner Partikel (im Bereich um 5 bis mittlerweile 1-2 μm), spezieller Säulenfülltechnik unter Hochdruck, empfindlicher Detektoren mit nur geringem Volumen (Durchflussküvetten ca. 10 μl) und pulsarmer Hochdruckpumpen. So können relativ kleinste Substanzmengen in Nano- und Picogramm-Bereich mit hoher Trennleistung innerhalb weniger Minuten chromatographisch getrennt werden [GEY, 2008].

5.1 Der Trennprozess

Das Probengemisch wird zwischen den zwei Phasen in der Trennsäule verteilt, indem mit der mobilen und stationären Phase in verschiedene Wechselwirkungen treten. Während eine Substanz auf Grund seiner physiko-chemischen Eigenschaften eine höhere „Affinität“ bzw. ein intensiveres Bindungsvermögen zu den Oberflächengruppen der stationären Phase besitzt, zeigt eine andere Substanz eine höhere Affinität zur der Trennphase und hält sich bevorzugt in der mobilen Phase auf. Diese ständig wiederholenden Wechselwirkungen werden an Hand des Verteilungskoeffizienten K , dem Quotienten der Konzentration einer Substanz in der stationären (c_{stat}) und mobilen Phase (c_{mob}), beschrieben (siehe Formel unten). Dieser drückt aus, ob sich eine Substanz bevorzugt mit der mobilen oder stationären Phase aufhält.

$$K_c = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s = stationäre Phase

C_m = mobile Phase

5.2 Peakverbreiterung

Die Peak- oder Bandenverbreiterung ist ein Phänomen, dass die zunehmende Verdünnung der Probenmoleküle innerhalb der Trennsäule als Resultat der auf Grund der Wechselwirkungen erfolgte. Die Peakverbreiterung kann mehrere Ursachen haben:

- Eddy-Diffusion, wobei die Probenmoleküle nicht linear, sondern auf „zick-zack-Wegen“ in der Säule sich verbreiten
- Strömungsverteilung, die Moleküle bewegen sich in der Mitte zweier Säulenpartikel schneller als in ihrer unmittelbaren Nähe
- Längsdiffusion, resultiert durch die Diffusion der Probemoleküle in der mobilen Phase selbst
- Stoffaustausch zwischen mobilen, stationären Phase und der in den Poren eingeschlossene „stagnierende“ mobilen Phase

Weiters kann auch eine Peakverbreiterung außerhalb der Säule beobachtet werden, wozu auch die Totvolumina, die außerhalb der Chromathographiesäule durch die Verbindungskapillaren zwischen Injektor und Säule bzw. Säule und Detektor sowie innerhalb der Detektorzelle selbst entstehen, beitragen. Die Verbindungskapillaren sollen einen kleinen Innendurchmesser haben (ca. 0,15 – 1,0 mm), jedoch nicht kleiner, damit es nicht zu Verstopfungen durch Probeverunreinigungen oder zu Auskristallisieren von Salzen aus der mobilen Phase führen. Die Folge wäre ein Druckanstieg, und eventuell sogar der Bruch der Küvettenfenster der Durchflusszelle [GEY, 2008].

5.3 Aufbau

Die mobile Phase befindet sich im Vorratsgefäß und wird mit Hilfe einer Hochdruckpumpe zum Injektor gefördert. Dort erfolgt die Aufgabe der Probe. Die Injektionsschleife ist beim Injizieren der Probenlösung mit dem HPLC-System verbunden, beim Befüllen der Schleife ist sie vom System getrennt. Die Injektion kann entweder manuell oder mit Hilfe eines Autosamplers erfolgen. Die auf die Schleife aufgetragenen Probenvolumen sind fix definiert. Mögliche Verunreinigungen der Probenextrakte werden durch die Vorsäule zurückgehalten, Die einzelnen Substanzen werden durch die Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase in der Trennsäule aufgetrennt.. Die Trennsäulen bestehen meist aus Edelstahl, aber auch aus Titan, Polymeren oder druckverfestigtem Glas. Die Säulenenden sind mit feinmaschigen Filtersieben verschlossen, und müssen ebenso wie die Verbindungskapillaren zum Injektor und zur Detektorzelle sehr totvolumenarm sein, um eine externe Peakverbreiterung auszuschließen. Das Füllmaterial der Trennsäule ist je nach eingesetzter chromatographischer Methode unterschiedlich. Bei der Normalphasenchromatographie wird für die stationäre Phase meist polares Silica verwendet. Silicagele sphärischer (kugelförmiger) oder irregulärer (gebrochene Partikel) Gestalt verfügen über freie Silanolgruppen und Aluminiumoxide und besitzen auf Grund von Aluminium- und Sauerstoffionen an ihrer Peripherie adsorptive Eigenschaften. Daher sind Probemoleküle mit freien Elektronenpaaren, funktionellen Gruppen oder Doppelbindungen in der Lage mit den Adsorbenten Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und induzierte Dipole sowie π -Komplexbindungen auszubilden. Die Elution erfolgt meist mit unpolaren Flüssigkeiten (Hexan, Isooctan) [GEY, 2008].

In der Umkehrphasenchromatographie (= Reversed-Phase-Chromatographie) ist die stationäre Phase unpolar. Die Oberflächensilanolgruppen von Silicagelen können mit verschiedenen funktionellen Gruppen chemisch modifiziert werden, z.B. durch Veresterung mit Alkoholen oder Silylierung mit alkylsubstituierten Silanen oder mit mono-, bi- oder trifunktionellen Reagenzien. . Die Dicke der Polymerschicht auf der Silicageloberfläche ist variierbar, die dicken Schichten schützen vor irreversiblen Adsorptionen und führen zu einer verbesserten pH-

Beständigkeit der RP-Phasen. Die hydrophoben Umkehrphasen (C₈- oder C₁₈-Trennphasen) werden mit polaren mobilen Phasen, wie Methanol- oder Acetonitril-Wasser-Gemische, eluiert.

Nach der Auftrennung der Substanzen erfolgt ihre Signalaufzeichnung mittels Detektoren, die mit Schreibern (Computer) verbunden sind. Für die Erzeugung eines Signals ist der Detektor verantwortlich. Neben universellen (UV, also Ultraviolett-Detektor) Detektoren gibt es auch solche, die auf die Erkennung bestimmter Substanzen, also auf eine selektive Arbeitsweise spezialisiert sind. Beispielsweise wird ein Fluoreszenzdetektor in der Aflatoxinanalyse mit Hilfe Vor- und Nachsäulenderivatisierungstechniken eingesetzt [GEY, 2008].

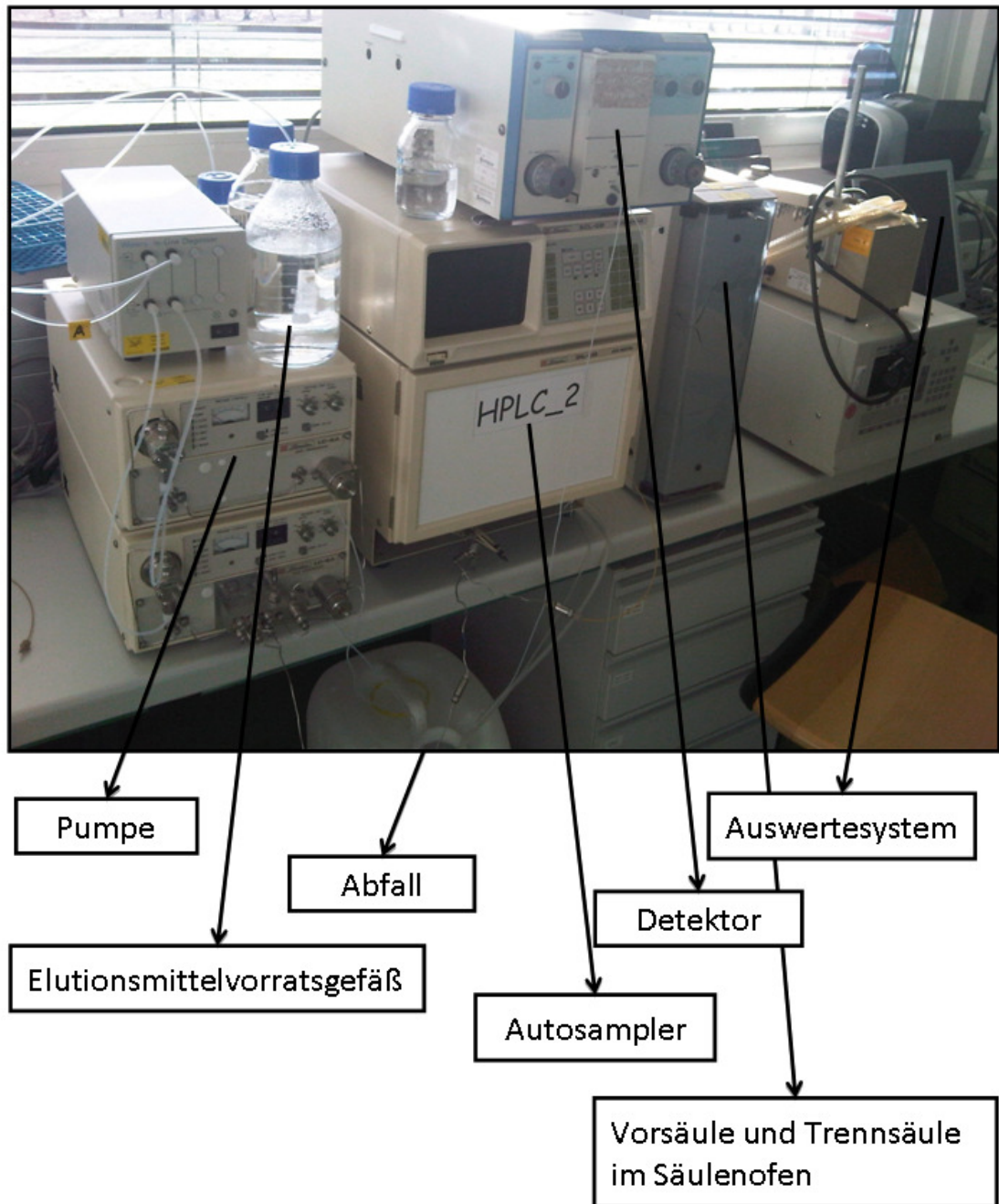


Abb. 4: Aufbau einer HPLC-Apparatur

6 Methoden der Probenvorbereitung für die Bestimmung der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 in LM

Zur Risikoabschätzung und dem Monitoring von Mykotoxinen in Agrarrohstoffen ist die Auswahl von geeigneten analytischen Methoden essentiell. Neben den Analysenverfahren leisten auch Probenvorbereitungsmethoden einen wichtigen Beitrag zur genauen Analyse von Mykotoxinen.

Durch die Vielzahl von Matrixbestandteilen ist eine qualitative oder quantitative Bestimmung, ohne Probenvorbereitung, schwierig. Daher ist die Probenvorbereitung eine der wichtigsten Schritte in die gesamte Kette der Analyse. Unter den verschiedenen Strategien, die für die Bestimmung von Mykotoxinen in Agrarrohstoffen als auch in biologischen Proben, wie z. B. in tierischem Gewebe, Urin etc., Verwendung finden, ist die wichtigste und beliebteste Probenvorbereitungstechnik die der Immunaффinitätschromatographie [RAZZAZI-FAZELI und REITER, 2010].

Probenvorbereitungsmethoden dienen einerseits der Entfernung von Matrixkomponenten, aber auch der Aufkonzentrierung der Analytmoleküle. Sie sind meist zeitaufwendig, arbeitsintensiv zum Teil nicht für die Analyse großer Probenmengen geeignet. Die Wahl der Methode ist von den zu untersuchenden Mykotoxinen, von ihrer Konzentrationen, von der Probenmatrix und von der instrumentellen Messtechnik abhängig. Des weiteren leistet die Probenvorbereitung einen großen Anteil der Analysenkosten, welcher rund 61% der Zeit und Kosten ausmacht. Die Selektivität der angewandten Probenreinigungsverfahren hat einen direkten Einfluss auf die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der gesamten analytischen Methode [RAZZAZI-FAZELI und REITER, 2010].

Die Analyse von Mykotoxinen lässt sich generell in 5 Bereiche einteilen. Sie beginnt mit der Probenahme, auf die die Homogenisierung der Probe (inkl. Reduktion der Gesamtprobe) folgt. Die Extraktion dient zum Herauslösen der Analytmoleküle und der darauffolgenden Aufreinigung („Clean-up“) der Probe werden Matrixbestandteile abgetrennt. Die letzten Schritte des Analysenverfahrens sind Auftrennung und Detektion [BISELLI, 2006].

Die Extraktion erfolgt meist mit organischen Lösungsmitteln (MeOH, ACN oder Aceton), welche je nach den physikalischen Eigenschaften der Analyten ausgewählt werden. Während polare Mykotoxine wie Deoxynivalenol (DON), problemlos mit Wasser extrahiert werden können, müssen andere nicht-polare Verbindungen mittels organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Die Extraktionstechniken sollten schnell, effektiv und wirtschaftlich sein. Auf chlorierte Lösungsmittel sollte aufgrund der Umweltverschmutzung verzichtet werden. Für die Extraktion der AFs aus komplizierten Matrices werden ACN-Wasser Mischungen bevorzugt, wobei bei einfachen Matrices eher mit MeOH-Wasser Mischungen gearbeitet wird [RAZZAZI-FAZELI und REITER, 2010]. Das Extraktionsschema von Mykotoxinen wird für jedes Mykotoxin in unterschiedlichen Matrices optimiert. Für flüssige Proben, wie Fruchtsäfte oder Milch, kann eine Flüssig-Flüssig-Trennung angewendet werden, die aber meist durch eine Festphasen- oder Immunaффinitätschromatographie ersetzt wird [RAZZAZI-FAZELI und REITER, 2010].

6.1 Extraktionstechniken

In der Europäischen Union sind die Mitgliedstaaten verpflichtet, nach Verordnung (EG) 882/2004 des Europäischen Parlaments, Lebens- und Futtermittelkontrollen zu überprüfen, die Rechtsvorschriften zu überwachen, sowie die auf allen Produktions-, Verarbeitungs- und Vertriebsstufen zu überprüfen [http://www.ages.at/uploads/media/Futtermittelbroschuere-2008_04.pdf, Zugriff am 15.09.2010].

Bei der Probenahme von Importkontrollen werden Lebensmittelmengen von über 10 kg gezogen. Trotz großer Mengen muss eine effiziente Teilchenzerkleinerung bzw. Homogenisierung der Proben erfolgen, um die Aussagekraft der Laboranalysen zu verbessern.

Es fanden bereits Ende der 1960er Jahre des 20. Jahrhunderts Entwicklungen statt, um die Homogenisierung der Proben zu verbessern, so wurde beispielsweise eine Mühle entwickelt, die fähig war Erdnussproben bis zu 25 kg fein zu vermahlen, es wurden oder aber auch Wasser-Slurries um feinere Partikel und eine gleichmäßigere Verteilung der Partikel in der Lebensmittelmatrix zu erzie-

len. Zudem konnten durch die Herstellung von „slurries“ auch kleinere Partikelgrößen und somit eine bessere Homogenisierung erzielt werden. Art der Zerkleinerung, Matrixbeschaffenheit, sowie Art des Lebensmittels und Probenmenge sind wichtige Faktoren, die vor einer Analyse berücksichtigt sein sollen [SPANJER et al., 2006].

Auch in der Analyse von Aflatoxinen werden immer häufiger Slurries hergestellt um die Homogenisierung der Analysenprobe zu verbessern. Eine Übersicht über kürzlich angewandten Methoden ist in Tab. 4 ersichtlich.

Tab. 4: Auswahl einiger Probenvorbereitungsmethoden

Untersuchte Lebensmittel	Slurry	Extraktion	Clean up Methode	LOD / LOQ (µg/kg)	Referenzen
Getrocknete Feigen, Erdnüsse, Haselnüsse, Paprika	-	Mobile Phase: ACN/MeOH/H ₂ O (2/3/6, v/v/v)	IAC, Aflaprep (R-Biopharm)	0,2 / -	BIRKAN, et al., 2008
Rosinen, Walnüsse, Erdnüsse, Feigen, Pistazien	-	Nüsse: MeOH/H ₂ O (80/20, v/v) + 10 % NaCl, Feigen u Rosinen: MeOH/ H ₂ O (80:20, v/v)	IAC, Aflatest (Vicam)	0,006 für AFB ₁ und AFG ₁ , 0,015 für AFB ₂ und AFG ₂ / 0,02 und 0,05	JUAN, et al., 2007
Getrocknete Feigen, Paprika, Erdnussbutter, Pistazien	-	Paprika und Feigen: MeOH/ H ₂ O (80/20, v/v) + 10 % NaCl Restl. Proben MeOH/ H ₂ O (80:20, v/v) + 10 % NaCl + Cyclohexan	IAC		STROKA, et al.2000
Sultaninen, Feigen		MeOH/H ₂ O (80/20, v/v) + 10 % NaCl	IAC, Aflatest (Vicam)	0,4 für AFB ₁ und 0,2 für AFB ₂	IAMANAKA, et al., 2005

Untersuchte Lebensmittel	Slurry	Extraktion	Clean up Methode	LOD / LOQ (µg/kg)	Referenzen
Feigen	-	MeOH/H ₂ O (80/20, v/v) + 10 % NaCl	IAC, Aflatest (Vicam)	0,1 / -	KARACA, et al., 2006
Weintrauben, Rosinen, Trester	Rosinen: Rosinen/Wasser (5/4, v/v)	getrocknete Trester: ACN/H ₂ O (60:40, v/v/v) Traubenmost-Püree und Slurry-Rosinen: ACN/ MeOH/H ₂ O (30:30:40, v/v/v)	IAC, Ochratest (Vicam)		SOLFRIZZO, et al., 2008
Trauben, Most	-	Most: n-Hexan/ Chloroform/H ₂ O (40:20:40)	IAC, Ochraprep (R-Biopharm)	0,01 für AFB ₁ und AFB ₂ / -	KHOURY, et al., 2007
Rosinen	Rosinen/Wasser (1/1, v/v)	MeOH/NaHCO ₃	IAC, Ochraprep (R-Biopharm)	0,3 für OTA	AKSOY, et al., 2006
Getrocknete Feigen, Sultaninen, Aprikosen	für OTA: Probe/Wasser (2:/10, v/v)	Für AFLA: MeOH/H ₂ O (60/40, v/v) + < 10 % NaCl	IAC, Ochraprep (R-Biopharm) und Aflaprep (R-Biopharm)	0,47 für OTA, 0,2 für AFLA / 0,68 für OTA	BIRKAN, et al., 2009

6.2 Clean-up

Die Empfindlichkeit einer Analysemethode hängt, besonders bei niedrigen Konzentrationen stark von der Probenaufreinigung ab. Verfahren zur Probenvorbereitung dienen in erster Linie der Entfernung störender Komponenten aus der Matrix aber auch der Aufkonzentrierung des Analyten [REITER, ZENTEK, RAZZAZI, 2009].

6.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid-Extraction = LLE)

Unter LLE versteht man das Ausschütteln gelöster Stoffe aus einer Lösung mit einem organischen, mit H₂O nicht mischbarem, Lösungsmittel. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid-Extraction = LLE) basiert auf der Verteilung des Analyts in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, in denen der Analyt von einer Phase in die andere übertragen wird. Die Phasen sind in der Regel eine wässrige Lösungsmittel (hydrophilen) und eine hydrophobe organische Lösungsmittel. Die Verteilung zwischen den Phasen ist eine Folge der thermodynamischen Kräfte bis das Gleichgewicht zwischen beiden Phasen erreicht ist. [MORTIMER und MÜLLER, 2003]. LLE war das erste Extraktionsverfahren welches für die Analyse von Aflatoxinen in Futter- und Lebensmittelproben bereits in den 60er Jahren eingesetzt wurde. Der größte Nachteil dieser Methode ist die große Menge organisches (früher auch chloriertes) Lösungsmittel, die für die Extraktion benötigt wird. Daher wurde diese Methode entweder durch Festphasenextraktion oder Immunoaffinitätsschromatographie ersetzt. Flüssig-flüssig-Extraktion wird aber noch zum Teil in der Probenvorbereitung von einigen Mykotoxinen angewandt. Beispiele hierfür sind zum Beispiel die Bestimmung von OTA in Gewebe von Schweinen vor der Analyse mit Immunoaffinitätssäulchen [MONACI et al., 2004], die Extraktion von OTA aus kontaminiertem Kaffee mit Phosphorsäure und Dichlormethan [PITTET und ROYER, 2002] oder die Extraktion von OTA aus kontaminierter Milch mit Methanol [GONZALEZ-OSNAYA et al., 2008]. Die Anwendung der Flüssig-Flüssig-Extraktion als einzelne Clean-up-Strategie oder gekoppelt mit anderen Clean-up-Methoden wurde bereits in Analysen in Weizen, Säuglingsnahrung, in alkoholischen Ge-

tränken, Säften und Limonaden verwendet [RAZZAZI-FAZELI und REITER, 2010].

6.2.2 Festphasen-Extraktion

Bei der Festphasen-Extraktion wird der Extrakt auf eine mit einem geeigneten Adsorbensmaterial gepacketer Glas- oder Kunststoffssäule aufgebracht. Das feste Adsorbens kann aus Kieselgel, Aluminiumoxid, modifiziertes Kieselgel oder Ionenaustauscher bestehen und dient bei der Extraktion als stationäre Phase. Nachdem der Analyt mit der stationären Phase in Wechselwirkung tritt, werden Matrixbestandteile durch Waschen entfernt, die Analytmoleküle werden jedoch an der Oberfläche der stat. Phase zurückgehalten. Die an der Oberfläche des Adsorbensmaterials angereicherte Analytmoleküle können schließlich mit geringen Mengen eines geeigneten organischen Lösungsmittels und hoher Elutionskraft eluiert werden [CAMMAN, 2001].

Die SPE kann als Reversed-Phase- oder Normale-Phase-Trennung eingesetzt werden. Reversed Phase SPE ist durch eine polare oder mäßig polare mobile Phase, einen nicht polaren Analyten und eine unpolare stationäre Phase charakterisiert, wo die hydrophile Kieselsäureoberfläche mit hydrophoben Gruppen modifiziert ist. In der normalen Phase SPE ist die stationäre Phase polar, während die mobile Phase unpolar ist. Nachteile der SPE sind die Abweichungen der Reproduzierbarkeit durch die Eigenschaften des Füllmaterials wobei Verunreinigungen zurückgehalten werden, die aber die spätere Bestimmung stören [GEY, 2008].

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction = SPE) besitzt eine enorme Bedeutung in verschiedenen Bereichen der analytischen Chemie einschließlich der pharmazeutischen Analyse, Lebensmittel- und Umweltanalytik. Ursachen dafür sind Effizienz, Schnelligkeit und eine einfache Durchführung sowie Automatisierung im Vergleich zu Flüssig-Flüssig-Extraktion und Immunaффinitätschromatographie. Darüber hinaus wird die Menge der verwendeten organischen Lösungsmittel reduziert und die Extraktionsdauer verkürzt, auch die Notwendigkeit der Verwendung von chloriertem Lösungsmittel entfällt [RAZZAZI-FAZELI und REITER, 2010]. Bei der SPE wird das Adsorbens in Kunststoff-

röhrchen zwischen porösen Fritten platziert. Spezifische SPE stationären Phasen, aber auch modifizierte SPE basierend auf der molekularen Erkennung wie beispielsweise die Immunaффinitätschromatographie finden häufig in der Mykotoxin-Aufreinigung Verwendung.

Eine andere Art der modifizierten SPE, multifunktionelle Säulen wurden schon in den 80-er Jahren des 20. Jahrhunderts für die Analyse von Mykotoxinen entwickelt. Unter dem Markennamen Mycosep[®] und / oder Multisep[®] Säulen sind sie kommerziell erhältlich und ermöglichen eine Probenreinigung in einem Schritt. Diese schnelle Clean-up-Methode wurde häufig für die Analyse des Trichothecenen Typ A und B in Lebensmittel- und in Futtermittelproben verwendet. Obwohl ausreichende Berichte die Verwendung dieser Säulchen in der Analyse verschiedener Mykotoxine wie Trichothecene, AF, OTA oder FUM vorliegen, werden sie in der Routinenanalyse immer mehr durch Immunaффinitätschromatographiesäulchen ersetzt. SPE werden jetzt jedoch häufig als Probenvorbereitungsmethode für die Multitoxinanalyse mittels LC-MS eingesetzt [RAZZAZI-FAZELI und REITER 2010].

Eine weitere Modifikationen der SPE ist Beispielsweise die Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD), wo eine Dispersion der Matrix und einer festen Phase für die Extraktion von viskosen, festen oder halbfesten Proben hergestellt wird, Säulchen gefüllt und anschließend extrahiert wird. In MSPD wird die Probe völlig zerstört und verteilt sich mit dem festen Trägermaterial homogen in der Säule.

Auch die Solid Phase Microextraction oder Festphasenmikroextraktion (SPME) ist eine neuere Methode der Probenvorbereitung. Bei dieser Methode adsorbiert ein Adsorptionsmittel in einem ersten Schritt den Analyten aus der Probe und im darauffolgenden Schritt desorbiert es den Analyten in der analytischen Säule. Die SPME basiert auf eine Extraktion mit weniger Lösungsmittel, wobei eine selektive Adsorption an ein beschichtetes Medium stattfindet [PAWLISZYN, 2002]. Diese einfache Technik erlaubt eine schnelle Extraktion von flüchtigen Substanzen. Vorteile dieser Methode sind geringe Probenvolumen und eine einfache Automatisierung vor GC- oder LC-Bestimmungen [RISTICEVIC et al.,

2002]. Sowohl MSPD und SPME konnten erfolgreich in der Mykotoxinanalyse eingesetzt werden. [RAZZAZI-FAZELI und REITER 2010].

6.2.3 Immunaффinitätschromatographie (IAC)

Die IAC in der Mykotoxinanalytik wurde ursprünglich als eine Modifikation der SPE entwickelt. Sie ist eine Trennmethode mit großer Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen. Sie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner (Antigen-Antikörper-Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip) [LOTTSPREICH und ENGEL 2009].

Dabei ist ein affiner Bindungspartner (Antikörper) kovalent an eine Matrix (Agarose- oder Polyacrylamid-Gel oder Glasperlen) gebunden und dient als immobilisierter Ligand. Sogenannte Spacer helfen, die aufgrund sterischer Hinderung entstehenden Bindungsprobleme auszuschalten [LOTTSPREICH und ENGEL 2009].

Stabilität über weite Bereiche des pH-Wertes, Ionenstärke und Stabilität gegenüber denaturierenden Substanzen sollen wichtige Charaktere der Matrix sein.

Selektive Bindung, hohe Durchlässigkeit und Porosität der Matrix ermöglichen den Analytmolekülen auch bei geringer Affinität eine Bindung mit den Liganden [LOTTSPREICH und ENGEL 2009].

Antigene aus dem Probenextrakt binden spezifisch an die Antikörper, nachdem ein Extrakt mit einem aufzureinigendem Analyten auf eine Immunaффinitätschromatographische Säule gebracht wird. Dabei entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe. Andere Bestandteile, insbesondere Matrixbestandteile, passieren unterdessen ungehindert die Säule, somit werden sehr saubere Extrakte erhalten [RAZZAZI-FAZELI und REITER 2010]. Anschließend werden die Analytmoleküle durch Denaturierung von den Antikörpern mit geeigneten organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril eluiert [RAZZAZI-FAZELI und REITER 2010].

Ein Nachteil bei der Verwendung der kommerziell erhältlichen IACs ist im Vergleich zu anderen Probenvorbereitungsmethoden die fehlende Wiederverwendbarkeit und damit auch die höheren Kosten der Probenvorbereitung. Die

Kapazität der Immunaффinitätssäulen ist von der Menge an immobilisiertem Antikörper abhängig [RAZZAZI-FAZELI und REITER 2010].

IACs werden sehr häufig in der Analyse der Mykotoxinen eingesetzt. Sie sind unter anderem bei der Analyse von Aflatoxinen in Pistazien, Feigen, Gewürze, Paprika, Frühstückscerealien, Trockenfrüchte, Getreide, Kaffee, Wein und Milch eingesetzt worden [RAZZAZI-FAZELI und REITER 2010].

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunaффinitätschromatographie zur Probenvorbereitung von Trocken- und Schalenfrüchten verwendet.

7 Material und Methoden

7.1 Reagenzien und Referenzproben

Acetonitril	HPLC gradient grade (Baker B.V.; Mellinckrodt, Deventer, Niederlande)
Aflatoxin Mix Kit-M	Lot. LB49762, Bestell.-Nr. 46304-U (Supelco; Taufkirchen, Deutschland)
Feigenslurry	Zertifiziertes Referenzmaterial getrocknete Feigen für AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Bestell.-Nr. T04150 (FAPAS®; York, UK)
H ₂ O	Milli Q (Millipour, USA)
Kaliumbromid	(Merck; Darmstadt, Deutschland)
Mais	Zertifiziertes Referenzmaterial Mais für AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Bestell.-Nr. T04105 (FAPAS®; York, UK)
Methanol	HPLC gradient grade (Baker B.V.; Mellinckrodt, Deventer, Niederlande)
PBS	(Sigma –Life Science–; Buchs, Schweiz)
Salpetersäure	Fisher Scientific; Longhborough, Leicestershire, UK
Stickstoff	verdichtet 5.0, Linde; Stadl-Paura, Österreich

7.2 Sonstige Gegenstände

Bechergläser	(Duran Group; Mainz, Deutschland)
Eprouvetten	(Merck; Darmstadt, Deutschland)
Erlenmeyerkolben	(Duran; Schott, West-Deutschland)
Faltenfilter: 595 ½; Ø 125 mm	(Whatman; Dassel, Deutschland)
Kunststofftrichter	(Hutzger, USA)
Immunaффinitätssäulchen: AFLA-Clean™, Lot.-Nr. 154, Bestell.-Nr. 10514	(LCTech; Dorfen, Deutschland)
Spatel	
Wägeschälchen	

7.3 Geräte

HPLC-Apparatur

Pumpe:	Shimadzu Liquid Chromatograph LC-9A (Kyoto, Japan)
Autosampler:	Merck-Hitachi AS-2000 (Darmstadt, Deutschland)
Säule:	Bischoff Chromatography Lichrospher 100_RP 18E 5 µm (250 x 4 mm) (Leonberg, Deutschland)
Vorsäule:	Bischoff Chromatography Lichrospher 100_RP 18E 5 µm (20 x 4 mm) (Leonberg, Deutschland)
Säulenofen:	Column thermostat, Jetstream 2 Plus (Erkerode, Deutschland)
Elektroch. Zelle:	R-Biopharm, Rhône LTD; 100 µA (Darmstadt, Deutschland)
Detektor:	Waters 474 Scanning Fluoreszenzdetektor: Ex-W: 365 nm; Em-W: 440 nm (Milford, USA)
Auswertesystem:	Stratos [®] ; Version 4.5; Polymer Laboratories (Shropshire, Großbritannien)

Sonstige Geräte

Analysenwaage: Mettler Toledo AB 184-S-A

Analysenwaage: Mettler Toledo PB 4002-S

Pipette Eppendorf: 0,5 – 10 µl

Pipette Eppendorf: 1,000 – 5,000 µl

Pipette Eppendorf: 100 – 1000 µl

Pipette Eppendorf: 20 – 200 µl

Pipette Eppendorf: 10 – 100 µl

Magnetrührer: Labinco

Mühle: Moulinette, Moulinex

Küchenmixer: Silva Standmixer

Vortex Mixer: IKAR MS1

Vakuumkammer: Alltech

7.4 Methoden

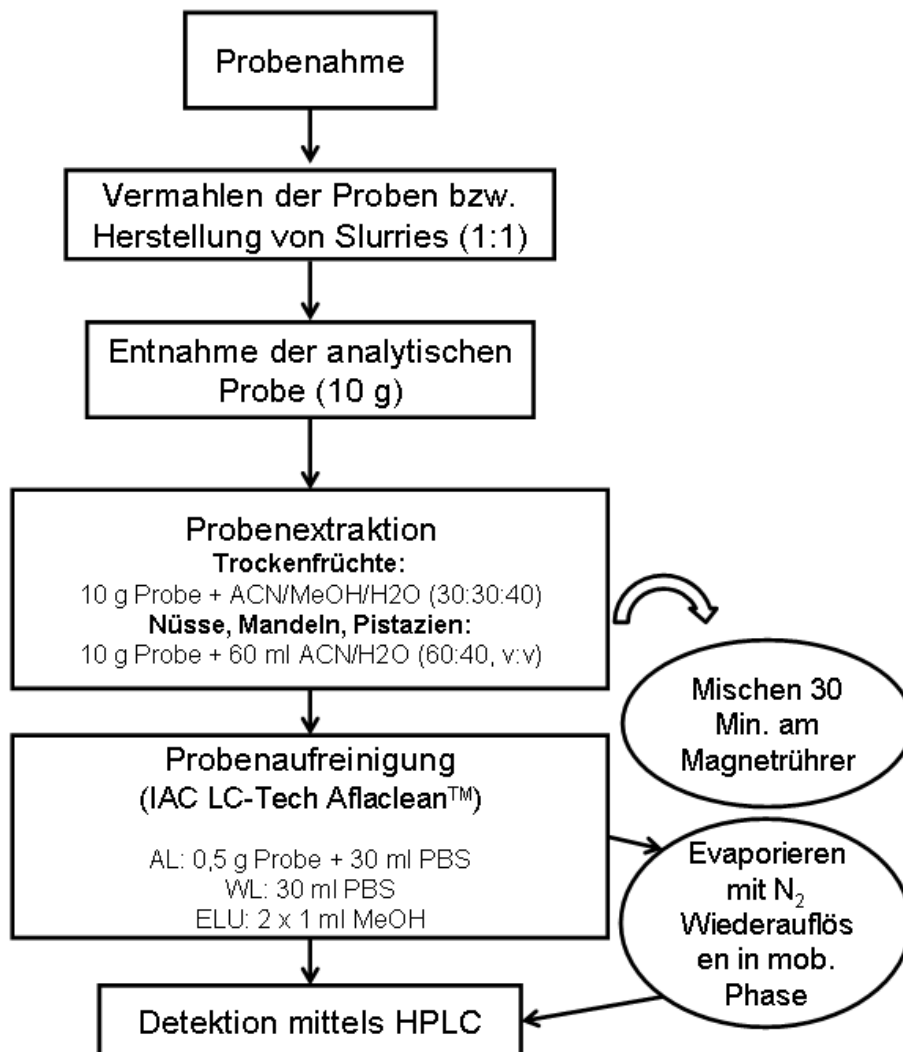


Abb. 5: Schematischer Ablauf der Aflatoxinbestimmung in Trockenfrüchten und Nüssen

7.4.1 Probenahme und Homogenisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 98 Proben, Trockenfrüchte und Nüsse, unterschiedlicher Herkunft untersucht (Tab. 5). Die Proben wurden am Wiener Markt erworben. Sie stammten, sowohl aus Handelsgeschäften als auch von Märkten (75 g – 500 g). Die Inhalte der Verpackungen wurden einzeln feingemahlen und gut durchmischt. Für Trockenfrüchte, wie zum Beispiel Feigen oder Rosinen,

wurde vor der Extraktion ein Slurry hergestellt um die Homogenisierung zu verbessern.

7.4.2 Extraktion

Aufgrund der geringen Probenmengen bei Pistazien, Mandeln und Erdnüssen (500-75 g) wurde in dieser Arbeit auf Slurries verzichtet und die Proben wurden trocken vermahlen. Mit Hilfe einer Moulinex Küchenmixer konnte eine Feinvermahlung und gründliche Homogenisierung der Proben erfolgen.

Bei Erdnüssen, Pistazien und Mandeln wurden jeweils 10 g feingemahlene Probe entnommen und mit 60 ml ACN/H₂O (60:40, v/v) versetzt, luftdicht verschlossen und für 30 Minuten am Magnetrührer homogenisiert, anschließend abfiltriert.

Obwohl für Trockenfrüchte etliche Versuche mit Trockenvermahlung bereits stattgefunden haben (Tab.4), wurden zwecks besserer Homogenisierung Slurries hergestellt. Phasentrennung bei Slurry-Herstellung ist ein häufiges Phänomen in der Probenvorbereitung. Um dies zu vermeiden wurde in dieser Arbeit die Methode nach Solfrizzo et al. gewählt [SOLFRIZZO et al., 2008]. Bei Trockenfrüchten wurde die ganze Probe 1:1 mit Wasser versetzt und mittels Küchenmixer homogenisiert (beispielsweise wurden 100 g Probe gemeinsam mit 100 mL H₂O_{bd} zerkleinert) und so ein Slurry hergestellt (Slurry, Abb. 6).



Abb. 6: Slurry einer Aprikosenprobe
(Wasser/Probe; 1/1, v/v)

Vom Slurry wurden anschließend 20 g entnommen (entspricht 10 g Probe) und mit 18 ml ACN 18 ml MeOH sowie 14 ml H_2O_{bd} versetzt. Unter Berücksichtigung des zur Slurryherstellung verwendeten Wassers entspricht dies einer ACN/MeOH/ H_2O (30:30:40, v/v/v). Das Probenextrakt wurde anschließend luftdicht verschlossen gut durchmischt (30 Min. am Magnet) und über einen Faltenfilter filtriert (Abbildung 7 und 8).

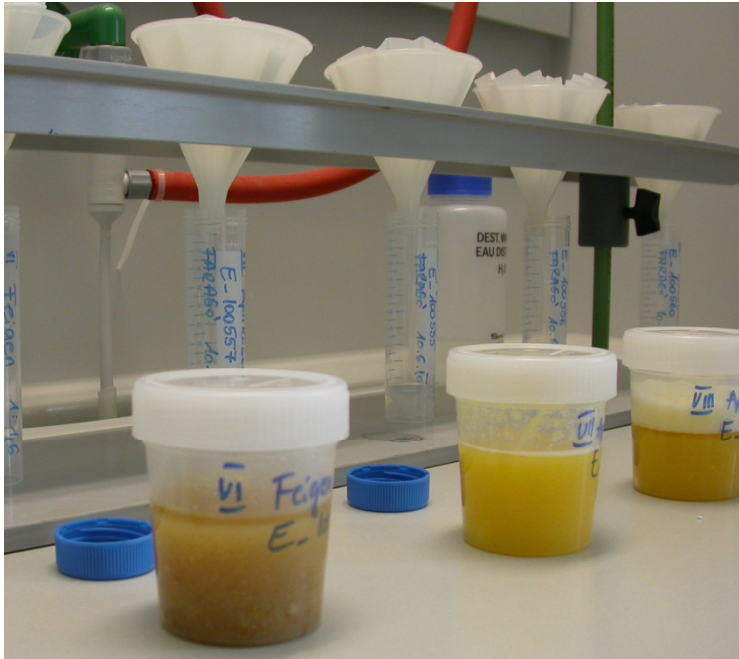


Abb. 7: Abfiltrieren der Slurryproben nach der Extraktion

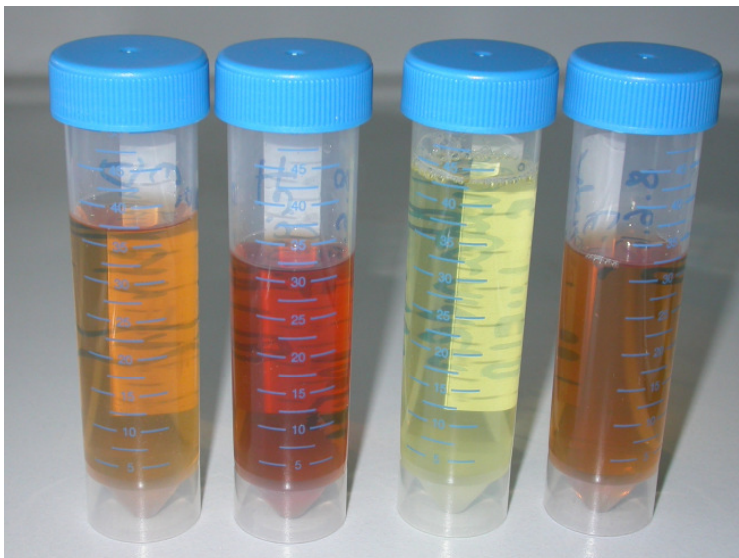


Abb. 8: Unterschiedliche Probenfiltrate (2 Feigen, Rosinen, Sultaninen)

Tab. 5: Übersicht über Anzahl und Herkunft der analysierten Lebensmittelproben

Sorte	Herkunftsland						
	Türkei	Südafrika	Chile	Iran	Tunesien	Israel	China
Aprikosen	5			1			
Babyfeigen	2			2			
Datteln				2	2	2	
Erdnüsse	5						2
Feige	7			6		1	
Mandeln				4			
Maulbeeren				4			
Pistazien	14			33			
Rosinen	1						
Sultaninen	3	1	1				
Summe	37	1	1	52	2	3	2
							98

7.4.3 Clean-up

Ein Aliquot des Extraktes 3 ml (=0,5 g Probe) wurde mit 30 ml PBS-Puffer (pH 7,2) verdünnt um die ACN und MeOH Konzentration möglichst gering zu halten. Das verdünnte Extrakt wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Immunitätssäulchen (LC-Tech Aflaclean™) aufgebracht. Während das Antigen (Aflatoxine) gebunden wird durchlaufen Matrixbestandteile ungehindert die Säule. Im nachfolgenden Waschschrift (30 ml PBS bei gleicher Flussrate) wurden allfällige weitere Matrixkomponenten abgetrennt. Mit Hilfe eines angelegten Vakuums konnte die von dem Waschschrift übrig gebliebene Restflüssigkeit aus der Säule entfernt werden. Eluiert wurde mit 2 x 1 ml MeOH, wobei nach Auftragen des MeOH dieses rund 5 Minuten in die Gelmatrix einwirken konnte um eine vollständige Denaturierung der Ag-Ak-Komplexe zu gewährleisten (Abb. 9). Zudem wurde auch noch Backflushing (Umkehrung der Flussrichtung mittels Spritze) angewandt um die Gelmatrix von allen Seiten anzugreifen. Das Eluat wurde in einer Glaseprouvette gesammelt (Abbildung 10), unter einem Stickstoffstrom eingengt (Abbildung 11), in 1 ml mobilen Phase wieder aufgenommen, mit Parafilm luftdicht verschlossen, gut durchmischt und anschließend in HPLC-Vials überführt.

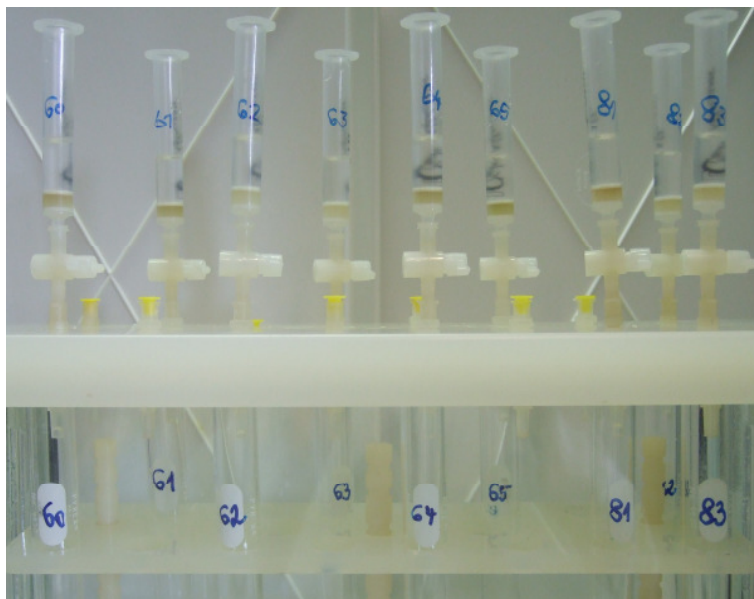


Abb. 9: Darstellung einer Vakuumkammer zur Probenaufreinigung mittels IACs

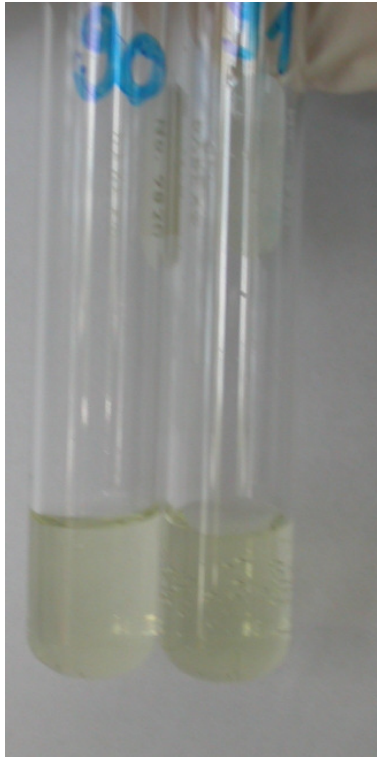


Abb. 10: Eluate zweier Feigenproben vor dem Abdampfen



Abb. 11: Abdampfen der Eluate unter einem Stickstoffstrom

7.4.4 Quantifizierung mittels HPLC

Die Quantifizierung der Aflatoxine erfolgte mit RP-HPLC, wobei je 100 µl Proben- und Standardmengen mittels Autosampler injiziert wurden. Die Auftrennung der Proben in die einzelnen Komponenten erfolgt in der Säule aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen. Eine Signalverstärkung für die AFB1 und AFG1 erfolgte die Elektrochemische Zelle und Zugabe von KBr in die mobile Phase. Die abschließende Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor.

Zusammensetzung von 1 l mobilen Phase:

620 ml H₂O

220 ml MeOH

160 ml ACN

119 mg KBr

350 µl 4M HNO₃

HPLC-Bedingungen:

Flussrate: 1 ml/min

Säulentemperatur: 50°

Stromstärke an der Elektrochemischen Zelle: 100 µA

Fluoreszenzdetektor: Ex-W: 365 nm; Em-W: 440 nm

7.4.5 Berechnung der Probenkonzentration

Die Probenkonzentrationen wurden mit Hilfe von Eichkurven ermittelt. Die tatsächlichen Probenkonzentrationen wurden aus den Flächen unter der Kurve (Area) von den Probensignalen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors gerechnet. Dabei wurde die Geradengleichung umformuliert:

$$y = kx + d$$

$$\text{ng / g Lebensmittelprobe}(x) = \frac{(y - d)}{k} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

y = Fläche unter der Kurve

k = Steigung der Gerade

d = Ordinatenabschnitt

2 = Verdünnungsfaktor (1 ml Eluat entspricht 0,5 g Probe)

7.4.6 Herstellung von Aflatoxin-Mixstandard-Lösungen

Die Konzentration der 1 ml Stocklösung Afla-Mix wurde mit 1000 µg/ml angenommen. Die darin enthaltenen Aflatoxine wiesen verschiedene Konzentrationen auf (AFB₁= 0,893 µg/ml, AFB₂= 0,304 µg/ml, AFG₁=1,046 µg/ml, AFG₂= 0,334 µg/ml), welche dann bei der Ermittlung der tatsächlichen Aflatoxin-Standard Konzentrationen berücksichtigt wurden. Aus der Stocklösung wurde durch Verdünnung täglich Arbeitslösungen hergestellt, mittels HPLC bestimmt, eine Geradengleichung erstellt welche zur Berechnung der Konzentration der zu untersuchenden Proben herangezogen wurde.

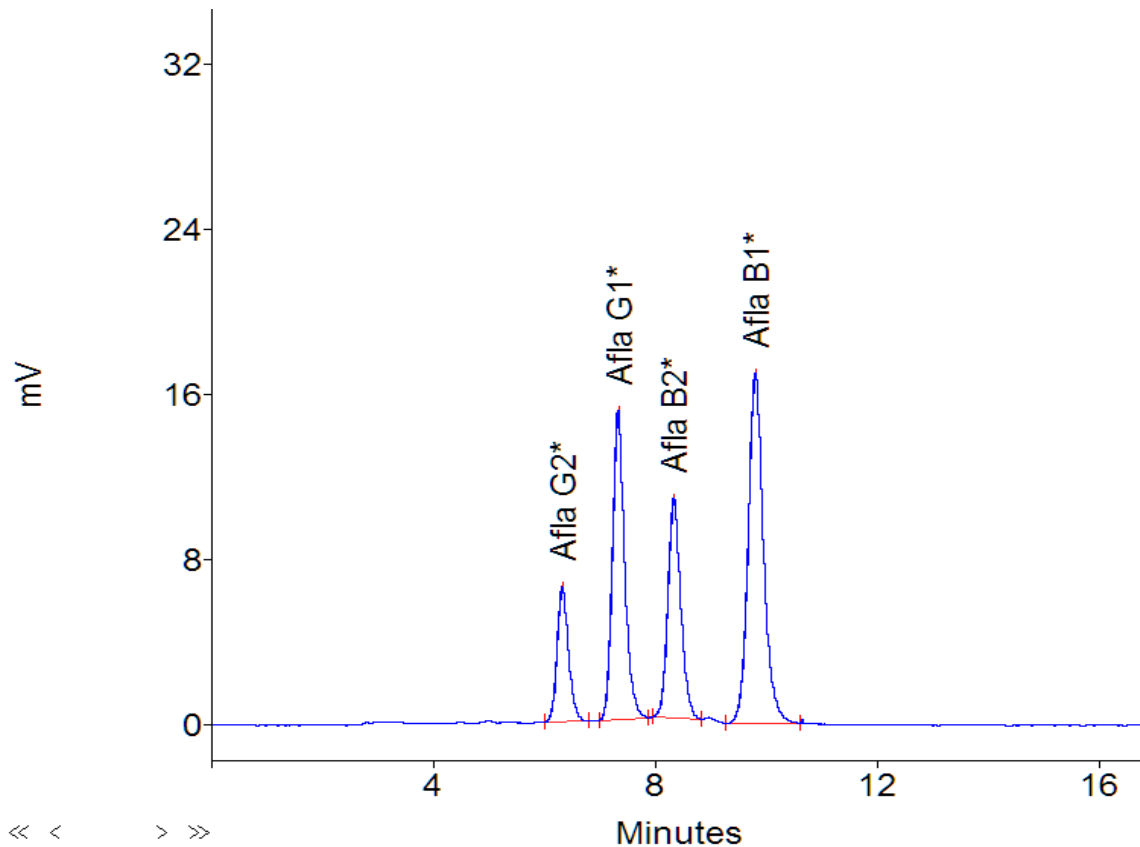


Abb. 12: Chromatogramm eines Aflatoxin-Mixstandards mit einer Konzentration von 10 ng/ml

7.4.7 Wiederfindung an zertifiziertem Referenzmaterial (Feigen-Slurry von FAPAS)

Nach Angaben des Herstellers enthielt 1 g Feigenlurry 9,3 ng AFT. Entsprechend dem optimierten Procedere (zuerst wurden die Angaben auf 1 g Probe bezogen) wurde die Wiederfindung bestimmt. Je 5 g Slurry wurden abgewogen und mit je 9 ml ACN und MeOH und 12 ml H₂O_{bd} versetzt (9 + 9 + 12 = 30 mL) was wiederum dem bereits vorhin genannten Verhältnis von ACN/ MeOH/H₂O (30/30/40, v/v/v) entspricht. Das Extrakt wurde anschließend für 30 Minuten am Magnetrührer gemischt und abfiltriert und nach dem bereits genannten Prozedere aufgereinigt, in das HPLC System injiziert und quantifiziert.

7.4.8 Standardaddition: Bestimmung der Wiederfindung von AFB₁ mit AFLA-Kit-Mix, Spiken des Eluates (Blankprobe)

Slurries für Feigen wurden in einem Verhältnis von 1 : 1,6 hergestellt. 10 g Probe wurde mit 16 ml Wasser versetzt und gemischt. Bei weiterer Probenvorbereitung wurden je 18 ml ACN und MeOH und 8 ml (24-16= 8) addiert, eine halbe Stunde lang gerührt, dann abfiltriert. Zu 3 ml (= 0,5 g) Aflatoxinfreiem Probenextrakt wurden 100 µl (10 ng) AFLA-Mixstandards (AFB₁: 0,893 µg/ml, AFB₂: 0,304 µg/ml, AFG₁: 1,046 µg/ml, AFG₂: 0,334 µg/ml) und 40 ml PBS hinzugefügt und auf die Säulen aufgetragen. Die Proben wurden mit IACs aufgereinigt und mittels HPLC-System gemessen. Die Untersuchten Proben wurden anschließend mit Standards der gleichen Konzentration an AFB₁ verglichen.

8 Ergebnisse und Diskussion

8.1 *Optimierung der Probenvorbereitung in der Analyse von Trockenfrüchten und Nüssen*

Die inhomogene Verteilung der zu untersuchenden Aflatoxine stellt nicht nur für die Probenahme, sondern auch für ihre Homogenisierung in den verschiedenen Lebensmittelmatrixen eine Herausforderung dar. Trockenvermahlung und Nassaufschlämmung zur Homogenisierung an unterschiedlichen Lebensmittelmatrixen wurden als Probenvorbereitungsverfahren bereits getestet, wobei eine Nassaufschlämmung (Slurry) bei der Bearbeitung von Rohkaffe-, Kakaobohnen, Trocken- und Schalenfrüchte empfohlen wurde [BISELLI, 2006].

8.1.1 Extraktion

Nachdem Vorversuche mit unterschiedlichen Zusammensetzungen von ACN/H₂O oder MeOH/H₂O als Extraktionsmittel nach der Herstellung eines Slurries zu einer Phasentrennung geführt haben, wurde in der Literatur nach einer geeigneten Methode gesucht. Für Feigen, sowie für Trockenfrüchte eignete sich die Angabe von Solfrizzo et al., wobei eine Extraktion mit einem Lösungsmittelgemisch von ACN/MeOH/H₂O in einem Verhältnis von (30/30/40, v/v/v) erfolgte [SOLFRIZZO et al. 2008]. In Tabelle 4 sind unterschiedliche Probenvorbereitungsmethoden in der Analyse von Trockenfrüchten zusammengestellt.

Anfangs wurden Slurries für Trockenfrüchte in einem Verhältnis von 1:1,6 (Probe / Wasser) hergestellt (10 g Probe mit 16 ml Wasser mittels Küchenmixer homogenisiert) wie von Solfrizzo et al beschrieben [SOLFRIZZO et al. 2008].

Da diese jedoch sehr flüssig waren, wurde das Probe/Wasser-Verhältnis auf 1/1 reduziert. Nach Herstellung des Slurries wurde das Extraktionsmittel wieder so angepaßt, dass 10 g Probe mit 60 ml (ACN/MeOH/H₂O, v/v/v) extrahiert wurden.

Mandeln, Erdnüsse und Pistazien wurden ohne Slurry-Herstellung extrahiert. Dabei wurden sie mit Hilfe einer Moulinex Mühle vermahlen, gut durchmischt

und zu je 10 g Probe 36 ml ACN und 24 ml H₂O_{bd} für die Extraktion hinzugefügt (ACN/H₂O, 60/40, v/v).

8.2 Validierung der Methode und Bestimmung der Wiederfindung

Anschließend wurde die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft. Dafür wurde die Wiederfindungsrate innerhalb eines Tages sowie an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt, wodurch die Verluste bei der Probenaufarbeitung zu erkennen wären.

8.2.1 Bestimmung der Wiederfindung (Spiken des Extraktes)

Eine aflatoxinfreie Feigenprobe wurde aufgearbeitet. Hierzu wurden jeweils 3 ml Feigenextrakt mit 40 ml PBS auf zwei kommerzielle IAC-Säulchen aufgebracht, zum Extrakt wurden zusätzlich 10 ng AFB₁ erhielt hinzugegeben. (gespiked). Nach dem Waschschrift und Elution mit 2 x 1 ml MeOH (inkl. backflushing) wurden die Eluate mit N₂ abgedampft und in 1 ml mobilen Phase wieder aufgelöst. Je 100 µl wurden mittels HPLC gemessen und anschließend ausgewertet.

Standards für die Eichgerade wurden in verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Die Konzentration der Stocklösung betrug 100 ng/ml konzentriert, woraus 400 µl entnommen und mit 1600 µl mobiler Phase verdünnt wurde. So wurde 2 ml 20 ng/ml konzentrierter Standard hergestellt, woraus weitere 1:1 Verdünnungen hergestellt wurden und somit Standardlösungen mit 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml)

Die Blankprobe (Feigenprobe ohne Zusatz von AFB₁-Standard) enthielt -wie erwartet- keine Aflatoxine, bei der mit AFB₁ versetzten Probe wurde eine Recovery von 93 % (MW aus Doppelbestimmung) beobachtet.

Die Probenvorbereitungsmethode erwies sich als geeignete Methode in der Aflatoxinanalyse, weitere Validierung der Methode war erforderlich.

8.2.2 Reproduzierbarkeit der Methode: Bestimmung der Wiederfindungsrate von Aflatoxinen in Feigenprobe an 3 aufeinanderfolgenden Tagen

Ein AF-negative Feigenprobe (aus biologischem Anbau) E_100495 wurde als Blank zur Validierung herangezogen. In den ersten 2 Tagen wurden jeweils 3 IACs und am dritten Tag wurden 6 IACs zur Probenvorbereitung verwendet. Diese erfolgte, wie in Kapitel Punkt 8.2.1 beschrieben. Auch hier wurden die Proben jeweils mit 100 μ l (100 ng/ml) AFB₁ gespiked, d. h. 10 ng AFB₁ wurde auf die Blankproben aufgebracht. Die Kalibrationskurve wurde aus jeweils 4 Standards erstellt (20, 10, 5 und 2.5 ng). An allen drei Tagen zeigten sich hohe Wiederfindungen und die ermittelten Konzentrationen lagen in allen Fällen über 9 ng AFB₁ / g Feige.

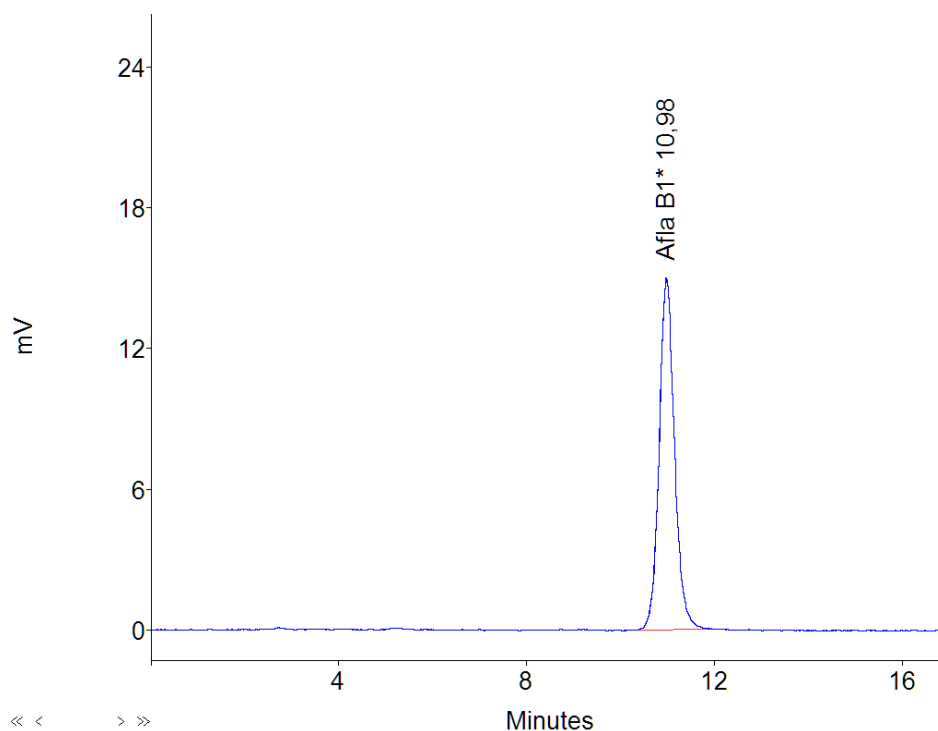


Abb. 13: Chromatogramm eines AFB₁ Standard mit 10 (ng/mL)

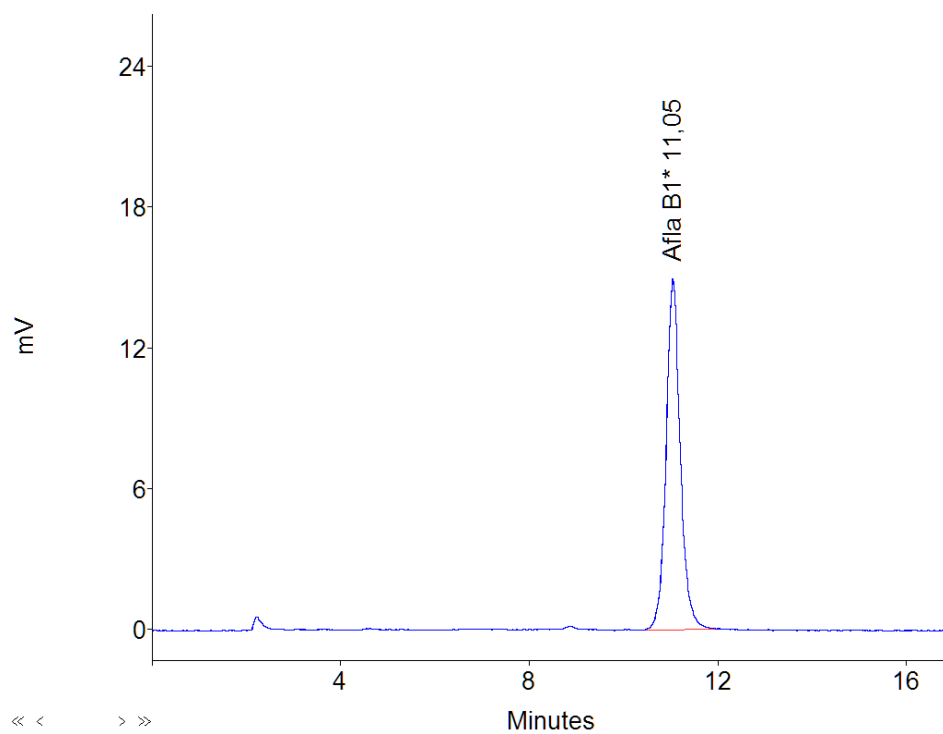


Abb. 14: Chromatogramm einer Feigenprobe (gespiked 10 ng/ml AFB₁)

Tab. 6: Wiederfindungsraten von AFB1 in einer Feigenprobe an 3 aufeinanderfolgenden Tagen

		AFB1				
		Konzentration (ng/g)	Recovery (%)	xM± RSD (%)	xM ± SD (µg/kg)	xM ± RSD%
<u>Tag 1</u>	1	9,19	92	92	9,51	94
	2	9,26	93	± 1,13	±	±
	3	9,07	91		0,38	1,00
<u>Tag 2</u>	1	9,21	92	92		
	2	9,09	91	± 0,54		
	3	9,15	92			
<u>Tag 3</u>	1	9,95	100	99		
	2	10,02	100	± 1,34		
	3	9,82	98			
	4	9,75	98			
	5	9,67	97			
	6	10,00	100			

8.2.3 Wiederfindung von AFT in Feigen-Slurry

Neben AFB1 wurde auch die Wiederfindung aller AFT (B1, B2, G1 und G2 überprüft). Hierzu wurden auf drei IACs Feigenextrakte aufgebracht. Eine Lebensmittelprobe (Feigen-slurry; Feige/Wasser, 1/1,6) wurde mit je 18 ml MeOH und ACN und 8 ml H₂O versetzt, mit Hilfe eines Magnetkernes für 30 Minuten gerührt und anschließend abfiltriert. Auf jedes der Säulchen wurden jeweils 3 ml Aliquot (=0,5 g Probe) nach der Verdünnung mit 30 ml PBS aufgebracht und mit 100 µL AFLA-Mix-Standard (AFB₁: 0,893 µg/ml, AFB₂: 0,304 µg/ml, AFG₁: 1,046 µg/ml, AFG₂: 0,334 µg/ml) gespiked. Als Waschlösung diente 30 ml PBS. Eluiert wurde mit 2 x 1 ml MeOH und Backflushing wobei jeweils 5 Minuten Einwirkzeiten nach dem Auftragen des MeOH auf die Säulen berücksichtigt wurde um die Ag-Ak-Komplex zu zerstören. Das Eluat wurde anschließend unter einem mit N₂-Strom eingedampft und in 1 ml mobilen Phase wieder aufge-

nommen. Standards für die Kalibrationskurve wurden in Konzentrationen von 20, 10, 5, 2.5 ng/ml hergestellt. In Tabelle 7 sind die Recoveries der einzelnen Aflatoxine zusammengefasst.

Tab. 7: Wiederfindungsraten aller Aflatoxine in einer Referenzprobe nach spiken mit einem Aflatoxin-Mixstandard

	Wiederfindung (%)			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
IAC 1	92	89	85	73
IAC 2	93	90	88	74
IAC 3	92	88	86	73
MW. ± SD	92 ± 0,47	89 ± 0,82	86 ± 1,25	73 ± 0,47

8.2.4 Bestimmung der Wiederfindungsraten mittels zertifiziertem Referenzmaterial von FAPAS (Feigen, T04150)

Um die Performance der entwickelten Methode zur Quantifizierung von Aflatoxinen in Trockenfrüchten zu überprüfen, wurde eine Referenzprobe (FAPAS T04150) mit bekannten Aflatoxinkonzentrationen (AFB₁ 4,51 ng/g, AFB₂ 1,39 ng/g, AFG₁ 2,7 ng/g, AFG₂ 0,55 ng/g) mit der zuvor optimierten Probenvorbereitungsmethode aufgearbeitet.

Es wurden also 5 g Slurry eingewogen, mit je 9 ml MeOH und ACN und 12 ml H₂O_{bd} versetzt und weiters wie im vorigen Kapitel beschrieben verarbeitet. Jeweils 3 ml Aliquot (=0,5 g Probe) wurden auf die Säule aufgebracht. Nach einem Waschschrift und der nachfolgenden Elution, wurde ein Aliquot mittels HPLC-FLD bestimmt. Die gemessenen Wiederfindungsraten an drei aufeinanderfolgenden Tagen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Validierung der Methode mit zertifiziertem Referenzmaterial (FAPAS T04150)

AFG ₂						
		Konzentration (ng/g)	Recovery (%)	x ± RSD%	x ± SD	X ± RSD%
<u>Tag 1</u>	1	0,52	95	95 ± 2,36	0,51 ± 0,07	92 ± 14,65
	2	0,54	98			
	3	0,51	93			
	4	0,52	94			
<u>Tag 2</u>	1	0,63	114	90		
	2	0,36	65	± 3		
<u>Tag 3</u>	1	0,50	91	93 ± 2,59		
	2	0,53	95			
	3	0,51	92			

AFB ₂						
		Konzentration (ng/g)	Recovery (%)	x ± RSD%	x ± SD	X ± RSD%
<u>Tag 1</u>	1	1,40	101	101 ± 0,85	1,49 ± 0,02	108 ± 1,52
	2	1,42	102			
	3	1,42	102			
	4	1,40	101			
<u>Tag 2</u>	1	1,65	119	116		
	2	1,57	113	± 3,51		
<u>Tag 3</u>	1	1,53	110	110 ± 0,19		
	2	1,54	111			
	3	1,54	110			

AFG ₁						
		Konzentration (ng/g)	Recovery (%)	x ± RSD%	x ± SD	X ± RSD%
<u>Tag 1</u>	1	3,33	125	127 ± 1,63	3,65 ± 0,1	136 ± 2,6
	2	3,405	126			
	3	3,455	128			
	4	3,44	127			
<u>Tag 2</u>	1	4,285	159	154		
	2	4,03	149	± 4,38		
<u>Tag 3</u>	1	3,62	134	135 ± 1,84		
	2	3,725	138			
	3	3,6	134			

Tab. 8: fortlaufend

AFB ₁						
		Konzentration (ng/g)	Recovery (%)	x ± RSD%	x ± SD	X ± RSD%
<u>Tag 1</u>	1	3,94	87	90 ± 2,03	4,54 ± 0,1	101 ± 1,2
	2	4,04	90			
	3	4,10	91			
	4	4,12	91			
<u>Tag 2</u>	1	5,17	115	114		
	2	5,08	113	± 1,24		
<u>Tag 3</u>	1	4,81	107	107 ± 0,33		
	2	4,78	106			
	3	4,81	107			

AFT (Aflatoxin total)						
		Konzentration (ng/g)	Recovery (%)	x ± RSD%	x ± SD	X ± RSD%
<u>Tag 1</u>	1	9,18	98	100,8 ± 1,6	10,2 ± 0,8	111,7 ± 8,7
	2	9,4	101			
	3	9,48	102			
	4	9,48	102			
<u>Tag 2</u>	1	11,73	126	122		
	2	11,04	118	± 4		
<u>Tag 3</u>	1	10,46	112	112,3 ± 0,5		
	2	10,57	113			
	3	10,45	112			

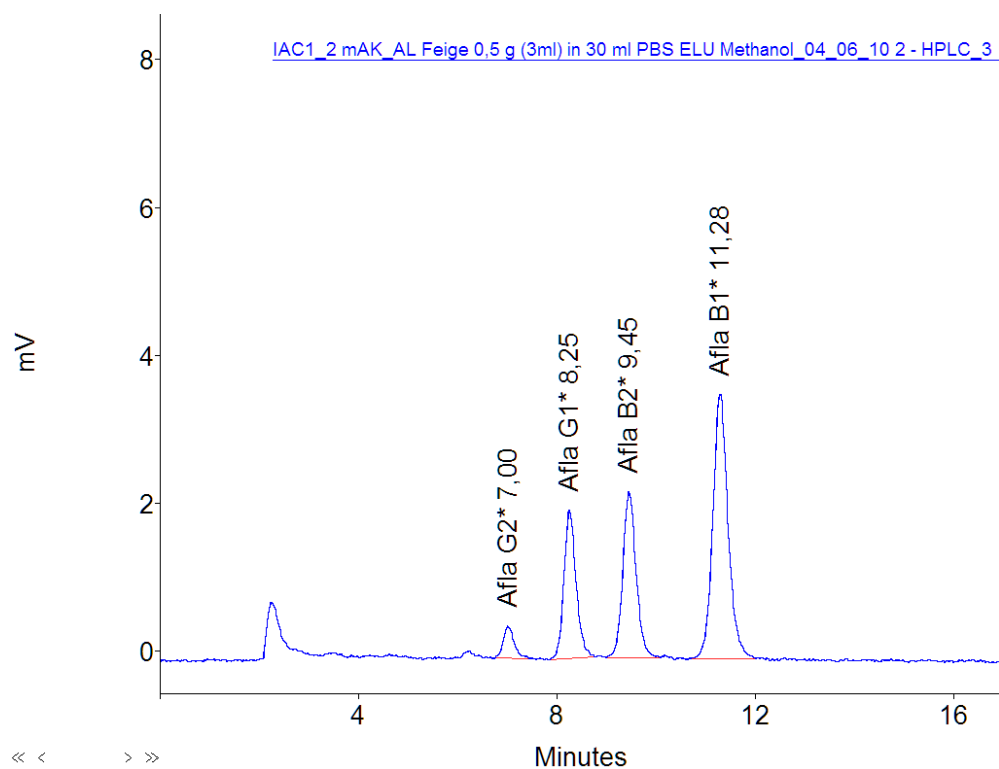


Abb. 15: Chromatogramm einer FAPAS Feigenprobe (T04150)

8.2.5 Bestimmung der Wiederfindung von Aflatoxinen in Pistazien

Neben Feigen wurden in dieser Arbeit auch Nüsse und andere Schalenfrüchte auf ihre Aflatoxingehalte untersucht. Auch hier wurde die optimierte Methode an IAC verwendet. Zur Methodvalidierung wurden Recoveries der mit Aflatoxin angereicherten Proben, Pistazien, bestimmt. Hierzu wurde eine Blankprobe (E_100732) entnommen, fein vermahlen und gut durchmischt. Die Probe (10 g) wurde mit 400 µl konzentriertem Aflatoxin-Mixstandard (AFB₁: 0,893 µg/ml, AFB₂: 0,304 µg/ml, AFG₁: 1,046 µg/ml, AFG₂: 0,334 µg/ml) angereichert.

Entsprechend dem genannten Prozedere wurden 3 x 10 g Probe wurde mit je 60 ml ACN/H₂O (60/40, v/v) versetzt und für eine halbe Stunde gut geschüttelt. Nach Filtration wurden je 3 ml Aliquot (0,5 g Probe) mit 30 ml PBS verdünnt und auf die IAC-Säulen aufgebracht. Die Tropfgeschwindigkeit war wie bisher (1 ml/min). Nach einem Waschschrift mit 30 ml PBS erfolgte die Elution mit 2 x 1 ml MeOH. Das Eluat wurde mit N₂ eingedampft und in 1 ml mobilen Phase wieder aufgelöst. Je 100 µl wurde zur Bestimmung in das HPLC-System eingebracht.

Tab. 9: Wiederfindungsraten von Aflatoxinen in Pistazienprobe mit zertifiziertem Aflatoxin-Mix-Standard (AFB₁: 0,893 µg/ml, AFB₂: 0,304 µg/ml, AFG₁: 1,046 µg/ml, AFG₂: 0,334 µg/ml)

	Wiederfindung (%)			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
IAC 1	88	94	91	49
IAC 2	89	92	90	48
IAC 3	88	95	91	46
MW ± SD	88 ± 0,47	94 ± 1,25	91 ± 0,47	47 ± 1,25

Hierbei wurden unzufriedenstellende Wiederfindungen von AFG₂ erreicht. Da AFG₂ in LM jedoch eine geringere Rolle übernimmt und die Wiederfindungsraten aller anderen AFs in einem akzeptablen Messbereich lagen, wurde diese

Methode, zur Bestimmung von unbekannten AFT-konzentrierten Pistazien und Nussproben herangezogen.

8.3 Kalibration mittels Standardgerade

Mit Hilfe Aflatoxinstandards wurden täglich Kalibrationskurven zur Ermittlung der tatsächlichen Probenkonzentrationen erstellt.

Als Stocklösung diente ein zertifizierter Aflatoxin-Mixstandard mit folgenden Konzentrationen:

AFB₁: 0,893 µg/mL

AFB₂: 0,304 µg/mL

AFG₁: 1,046 µg/mL

AFG₂: 0,334 µg/mL

Zur Bestimmung unbekannter Proben wurden Kalibrationskurven erstellt. Die Meßwerte der unbekannten Proben sollten im Bereich der Kalibrationskurve liegen. Täglich wurden Vier-Punkt-Kalibrationen hergestellt Und für jedes Aflatoxin eine Standardgerade erstellt (Abb. 15, 16, 17, 18).

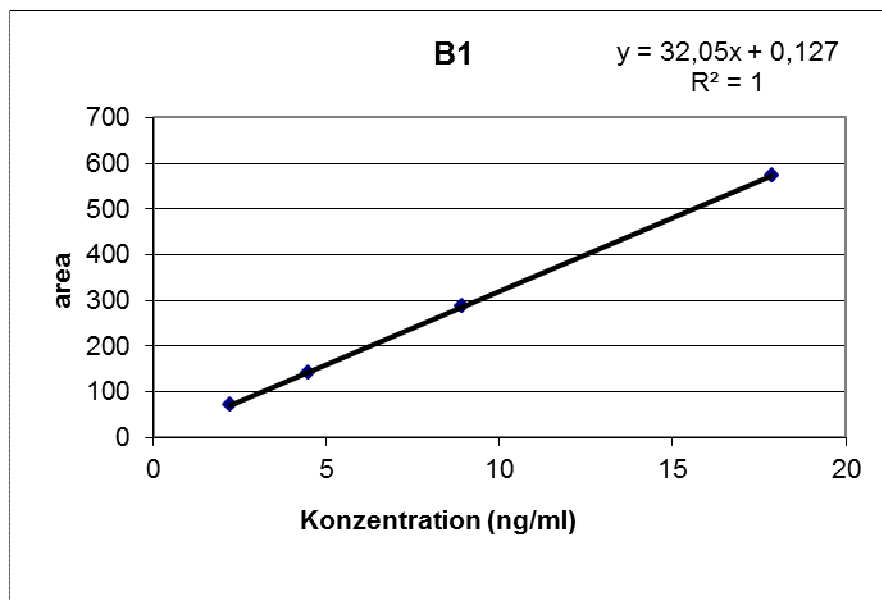


Abb. 16: Eichgerade für AFB₁

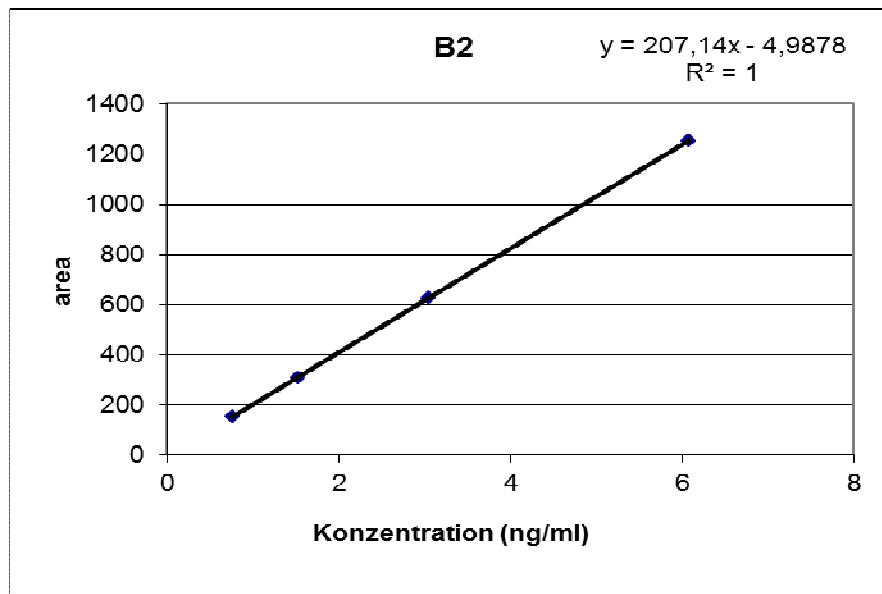


Abb. 17: Eichgerade für AFB₂

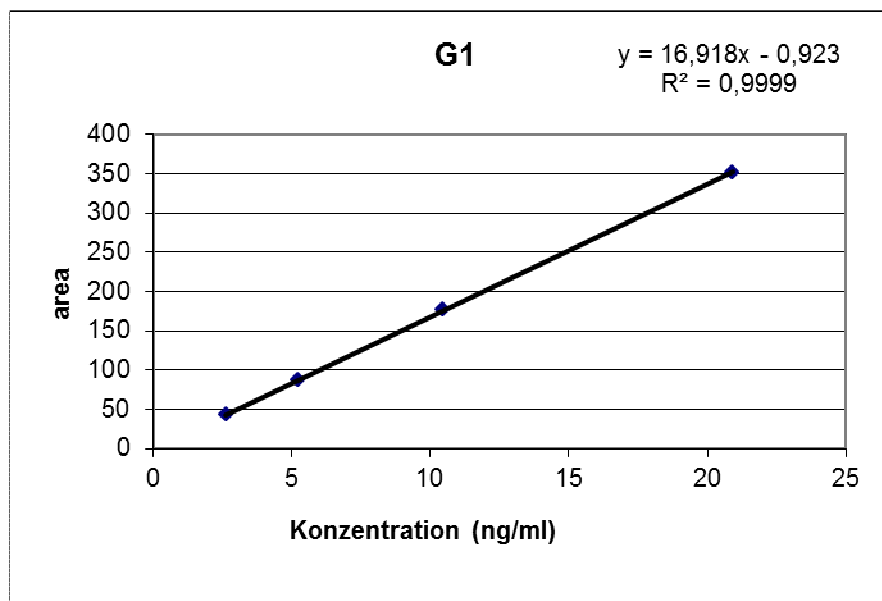


Abb. 18: Eichgerade für AFG₁

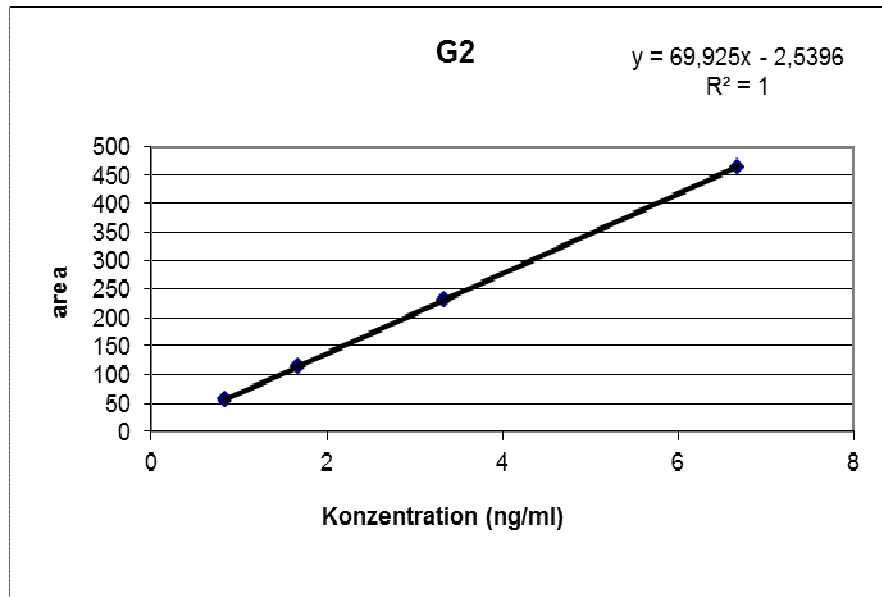


Abb. 19: Eichgerade für AFG₂

8.4 Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen

Bei der Auswertung und Quantifizierung der Aflatoxine wurden zwei wichtige Kenngrößen berücksichtigt. Die Nachweisgrenze (LOD = Limit of Detection) stellt jenen Wert einer Messung dar, bei der das Signal der Probe gerade noch vom Rauschen der Basislinie zu unterscheiden ist. Als Wert für Signale, die gerade noch vom Rauschen unterschieden werden können gilt ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3/1. Die Quantifizierungsgrenze (LOQ = Limit of Quantification) gibt die geringste Konzentration eines Analyten an, die quantitativ mit ausreichender statistischer Sicherheit bestimmt werden kann. Das Signal/Rausch-Verhältnis wird hierbei mit 10/1 angegeben [CAMMAN, 2001].

Anhand der Chromatogramme von positiven Proben wurden folgende Werte für die einzelnen Aflatoxine ermittelt (Tab. 11).

Tab. 10: Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen der einzelnen Aflatoxine

Aflatoxin	Nachweisgrenze (ng/g)	Quantifizierungsgrenze (ng/g)
AFB ₁	0,05	0,2
AFB ₂	0,04	0,25
AFG ₁	0,06	0,26
AFG ₂	0,08	0,3

Ein Vergleich der gewählten Extraktionstechnik (nach SOLFRIZZO et. al., 2008) hinsichtlich der LOD/LOQ–Werten mit den in Tab. 4 bereits erwähnten Techniken zeigte, dass die in dieser Arbeit sehr niedrige Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen für AFs, (Tab. 10), niedrigere LOD-Werte (0,006 ng/g für AFB₁ und für AFG₁ bzw. 0,015 ng/g für AFB₂ und für AFG₂) wurden für ähnliche Matrices wurden nur von Juan et al. berichtet [JUAN et. al., 2007].

8.5 Bestimmung von Lebensmittelproben

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 98 Lebensmittelproben untersucht. Neben Aprikosen, Rosinen, Sultaninen, Datteln, Feigen, Maulbeeren, Erdnüssen und Mandeln bestanden die meisten Proben (41) aus Pistazien.

8.5.1 Lebensmittelproben mit AF-Konzentrationen unter der Quantifizierungsgrenze

Lebensmittelproben mit Aflatoxinkonzentrationen über der Nachweisgrenze und unter der Quantifizierungsgrenze wurden in Tabelle 11 aufgelistet. Die Menge der enthaltenen Aflatoxine lag im Spurenbereich, weshalb sie nicht quantifiziert wurden. In diese Kategorie fielen 4 Proben (4%), alle waren geschälte Pistazien (z.B.: Abb. 19, 20)

Tab. 11: Positive LM-Proben unter der Quantifizierungsgrenze

Lebensmittelprobe		Aflatoxingehalt (ng/g)					
Sorte		Herkunftsland	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFT
E_100713	Pistazie geschält	Iran (Supermarkt)	0,185	n. v.	0,158	n. v.	0,34
E_100716	Pistazie geschält	Iran (Supermarkt)	0,078	n. v.	0,068	n. v.	0,15
E_100718	Pistazie geschält	Iran (Naschmarkt)	0,158	n. v.	n. v.	n. v.	0,16
E_100740	Pistazie geschält	Iran (Brunnenmarkt)	0,128	n. v.	n. v.	n. v.	0,13
Nachweisgrenze			0,05	0,04	0,06	0,08	
Proben über NG			4 (4%)	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)	

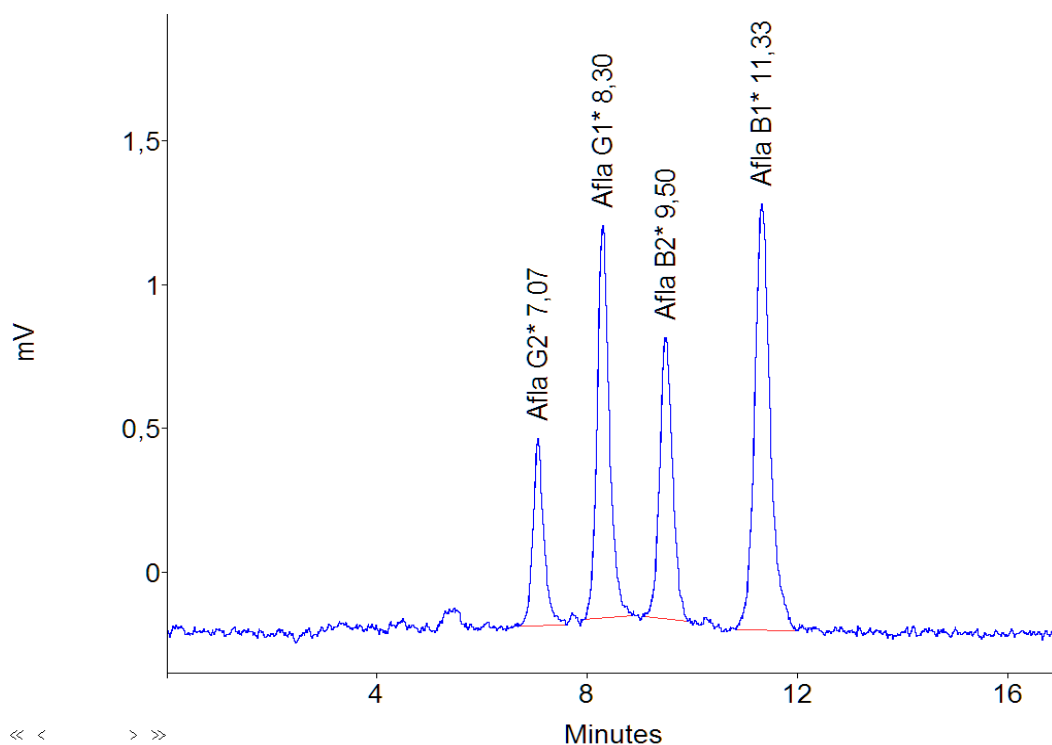


Abb. 20: Chromatogramm eine AF-Mix Standard-Lösung (AFB₁: 0,893 ng/mL, AFB₂: 0,304 ng/mL, AFG₁: 1,046 ng/mL, AFG₂: 0,334 ng/mL)

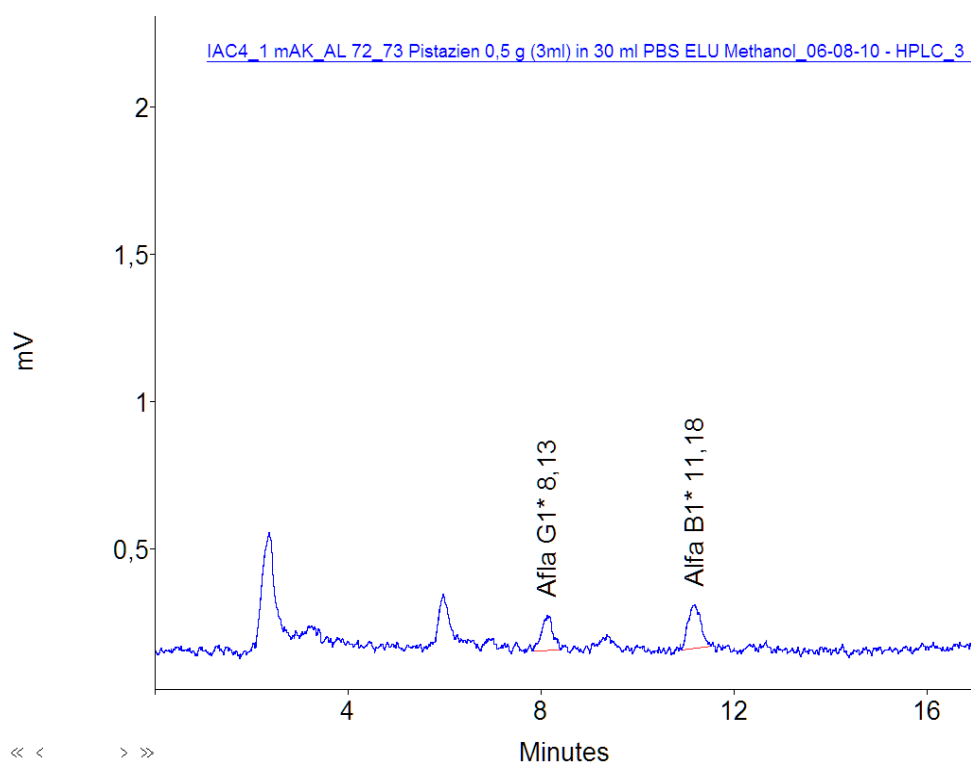


Abb. 21: Chromatogramm einer positiven Pistazienprobe (E_100713)

8.5.2 Lebensmittelproben mit AF-Konzentrationen über der Quantifizierungsgrenze

12 Lebensmittelproben (12% aller Proben) enthielten Aflatoxin-Konzentrationen, über der Quantifizierungsgrenze. Alle Lebensmittelproben waren Pistazien, teils ganz, teils gehackt, jedoch alle geschält (z.B. Abb. 21).

Tab. 12: Positive Lebensmittelproben über die QG

Lebensmittelprobe		Aflatoxingehalt (ng/g)					
Sorte		Herkunftsland	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFLA-Total
E_100676	Pistazien geschält	Türkei (Naschmarkt)	0,815	0,398	n. v.	n. v.	1,21
E_100677	Pistazien geschält	Türkei (Naschmarkt)	0,616	0,048	n. v.	n. v.	0,66
E_100701	Pistazien geschält	Iran (Brunnenmarkt)	140,56	24,95	n. v.	n. v.	165,51
E_100711	Pistazien geschält	Iran (Supermarkt)	0,415	0,025 < LOD	0,245 < LOQ	n. v.	0,69
E_100717	Pistazien geschält	Iran (Naschmarkt)	0,235	n. v.	n. v.	n. v.	0,24
E_100720	Pistazien geschält	Iran (Naschmarkt)	0,425	0,03 < LOD	n. v.	n. v.	0,46
E_100721	Pistazien geschält	Iran (Naschmarkt)	0,4	0,03 < LOD	0,105 < LOQ	n. v.	0,54
E_100722	Pistazien gehackt	Iran (Naschmarkt)	76,595	8,188	0,75	n. v.	85,53
E_100723	Pistazien gehackt	Iran (Naschmarkt)	303,5	23,113	0,845	n. v.	327,46
E_100724	Pistazien gehackt	Iran (Naschmarkt)	405,36	38,703	0,845	n. v.	444,91
E_100789	Pistazien geschält	Iran (Naschmarkt)	0,335	n. v.	0,258	n. v.	0,59
E_100790	Pistazien geschält	Iran (Naschmarkt)	0,44	n. v.	1,033	n. v.	1,47

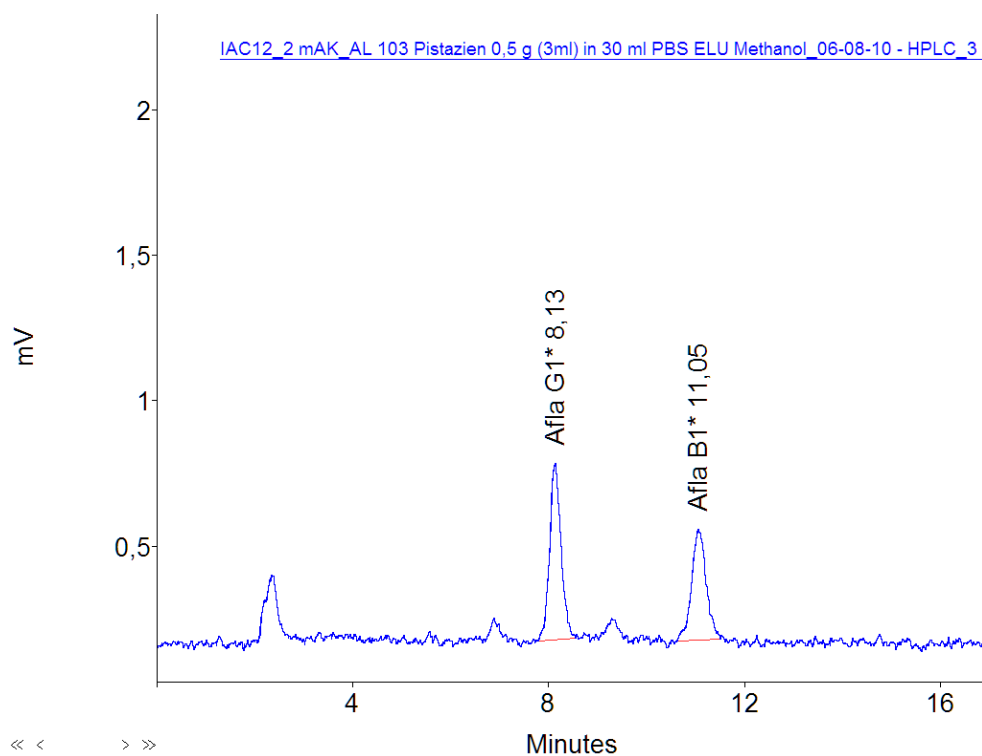


Abb. 22: Chromatogramm einer positiven Pistazienprobe AFG1 und AFB1 (E_100790)

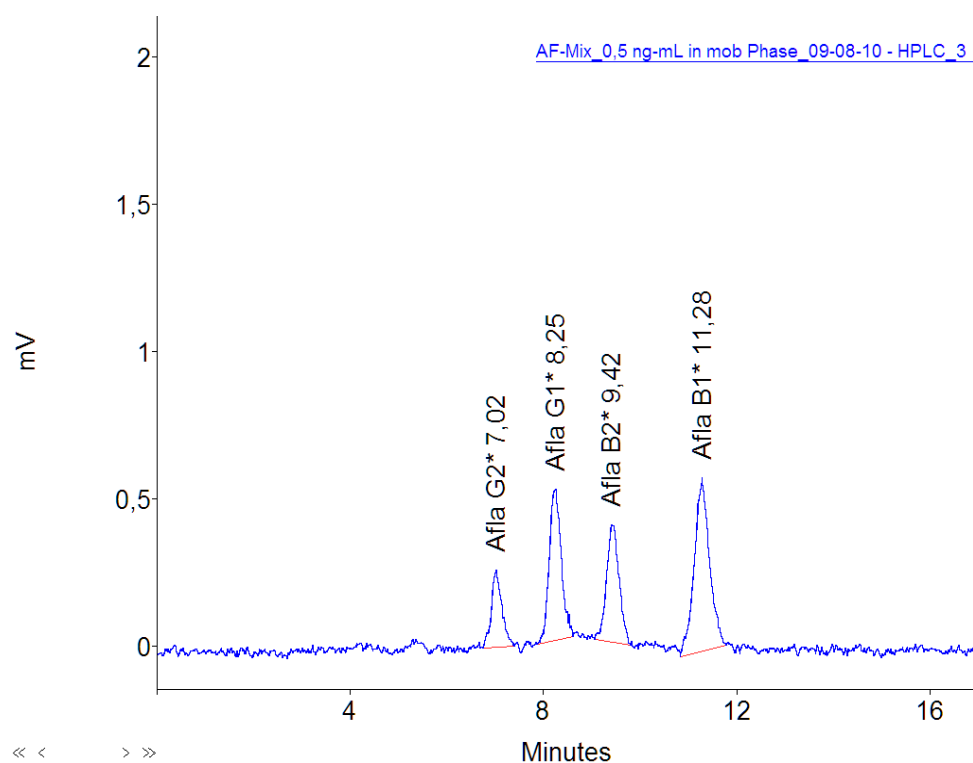


Abb. 23: Chromatogramm eine AF-Mix Standard-Lösung (AFB₁: 0,446 ng/mL, AFB₂: 0,152 ng/mL, AFG₁: 0,523 ng/mL, AFG₂: 0,167ng/mL)

8.5.3 Lebensmittelproben mit Aflatoxinkonzentrationen über den gesetzlich erlaubten Höchstwerten

Von den 12 Lebensmittelproben, die über die Quantifizierungsgrenze lagen, hatten insgesamt 4 Pistazienproben die von der EU erlaubten Höchstwert von 8 ng/g für AFB₁ überschritten (Abb. 24 und Abb. 25 im Vergleich zur Standard wie Abb. 23). Alle Proben wiesen Gesamtaflatoxinkonzentrationen über 10 ng/g auf. Die Aflatoxingehalte der Proben sind in Tab. 12 hervorgehoben.

Im Zuge dieser Arbeit wurden Pistazienproben gefunden, die den gesetzlich festgelegten Höchstwert bis zu 44-mal überschritten haben. Auffällig war, dass überwiegend in geschälten und gehackten Pistazien AFs nachgewiesen werden konnten.

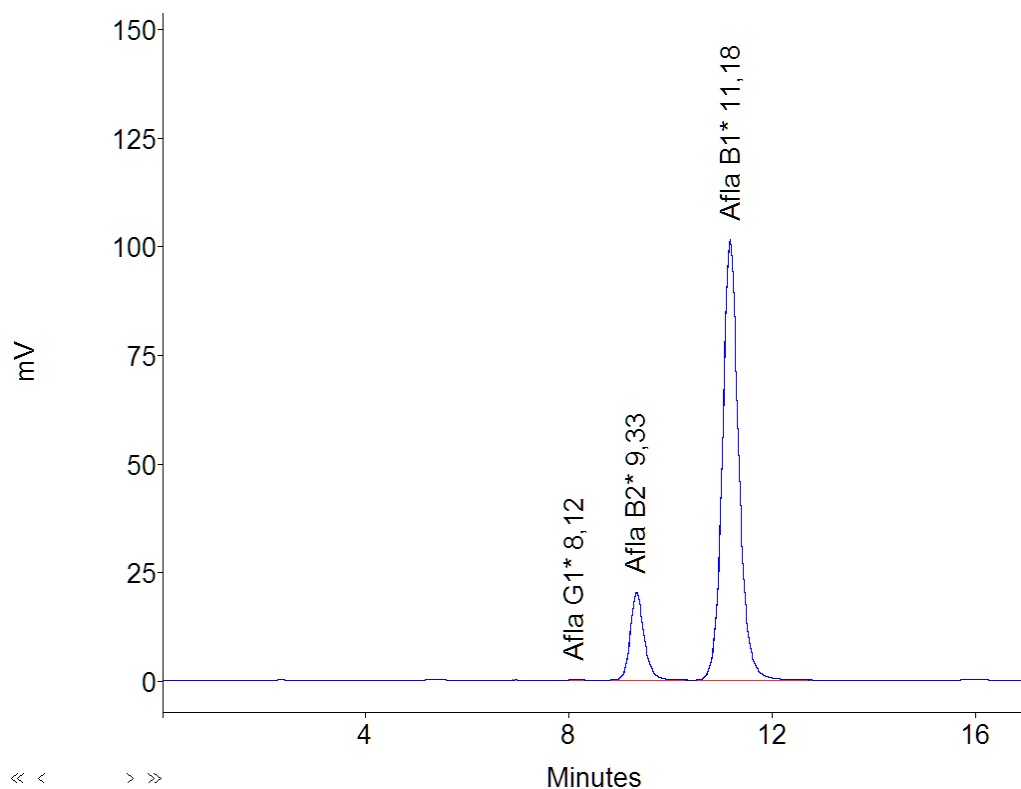


Abb. 24: Pistazienprobe E_100724

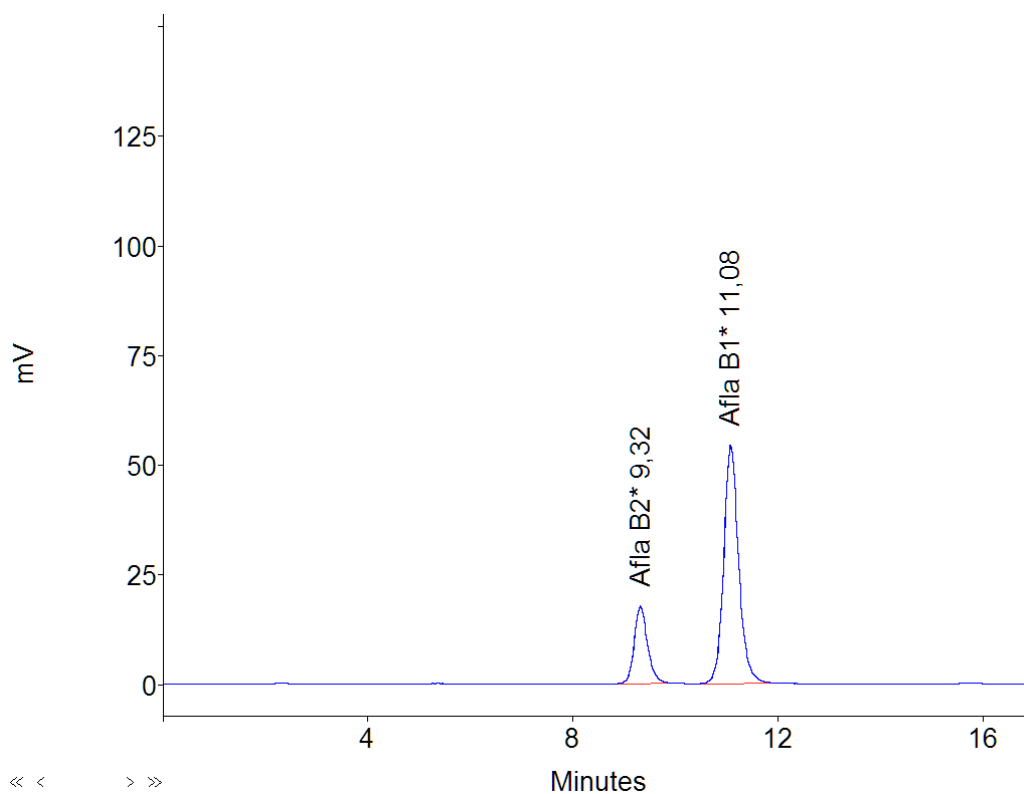


Abb. 25: Pistazienprobe E_100701

Damit die einzelnen Chromatogramme in der Skalierung vergleichbar bleiben können, wurden bei den Proben E_100701 und E_100724 nur je 1 ml Extrakt, also 0,167 g Probe auf die IAC Säule gebracht.

8.5.4 Lebensmittelproben in denen keine Aflatoxine nachgewiesen werden konnten

Von den insgesamt 98 untersuchten Lebensmittelproben waren 82 aflatoxinfrei. Zuerst wurden verschiedene Trockenfrüchte untersucht, wie Feigen, Babyfeigen, Rosinen, Sultaninen, Aprikosen, Datteln und Maulbeeren, später zusätzlich noch Ernüsse und Mandeln. Aufgrund ihrer verschiedenen Matrix zeigten die Chromatogramme der Trockenfrüchte unterschiedlichen Peaks nach der Injektion auf die analytischen Säule (Abb. 27, 28, 29, 31, 32, 33).

Die Probenvorbereitung von Babyfeigen wäre noch zu optimieren, da die Chromatogramme teilweise Störpeaks bei einer Retentionszeit zwischen 8 und 10 min gezeigt haben (Abb.30). Da diese Proben jedoch generell negative Ergebnisse zeigten, wurde die Methode nicht weiteroptimiert.

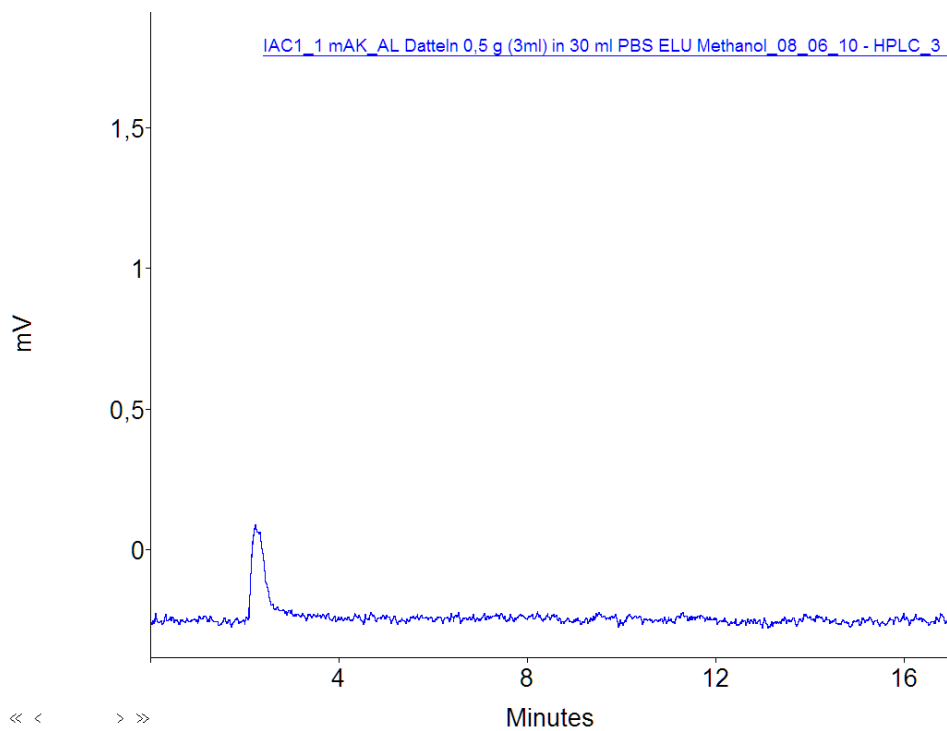


Abb. 26: Chromatogramm einer Dattelprobe

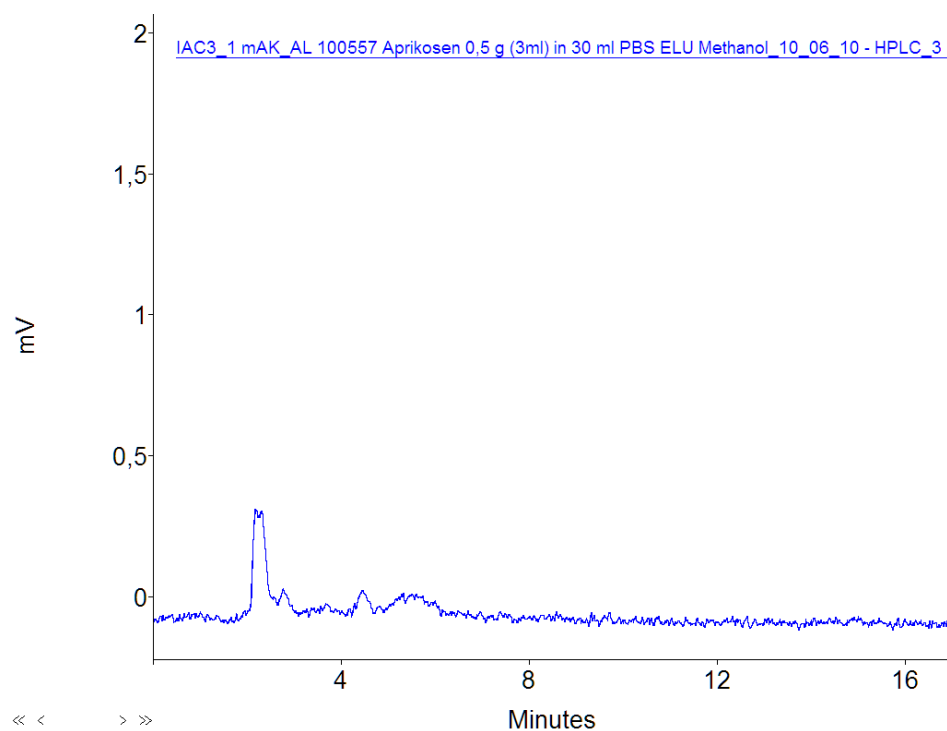


Abb. 27: Chromatogramm einer Aprikose

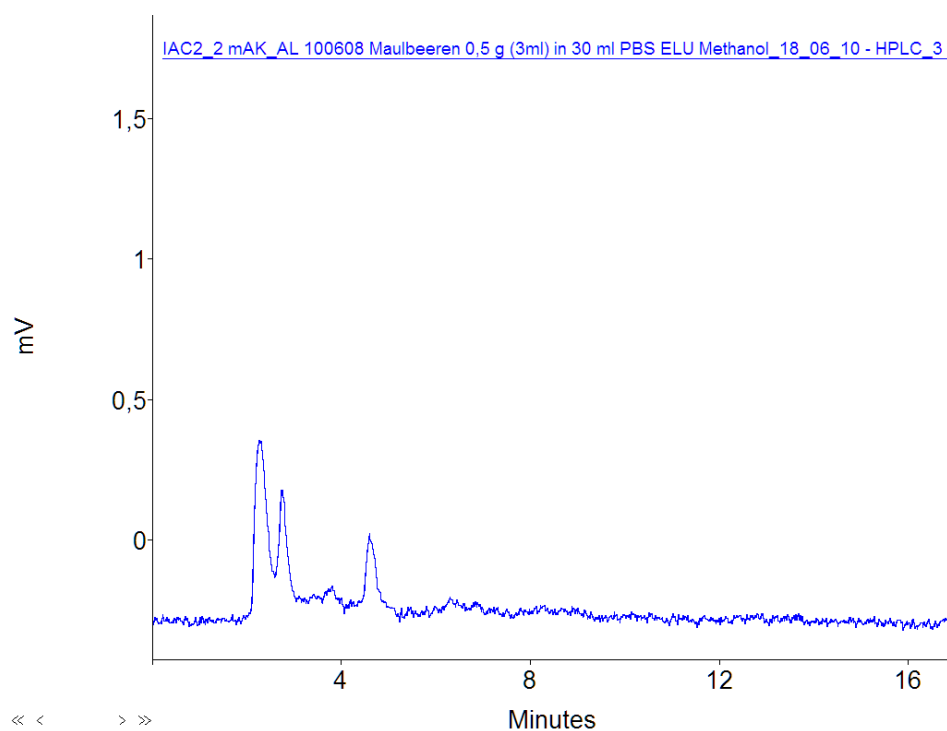


Abb. 28: Chromatogramm einer aflatoxinfreien Maulbeerprobe

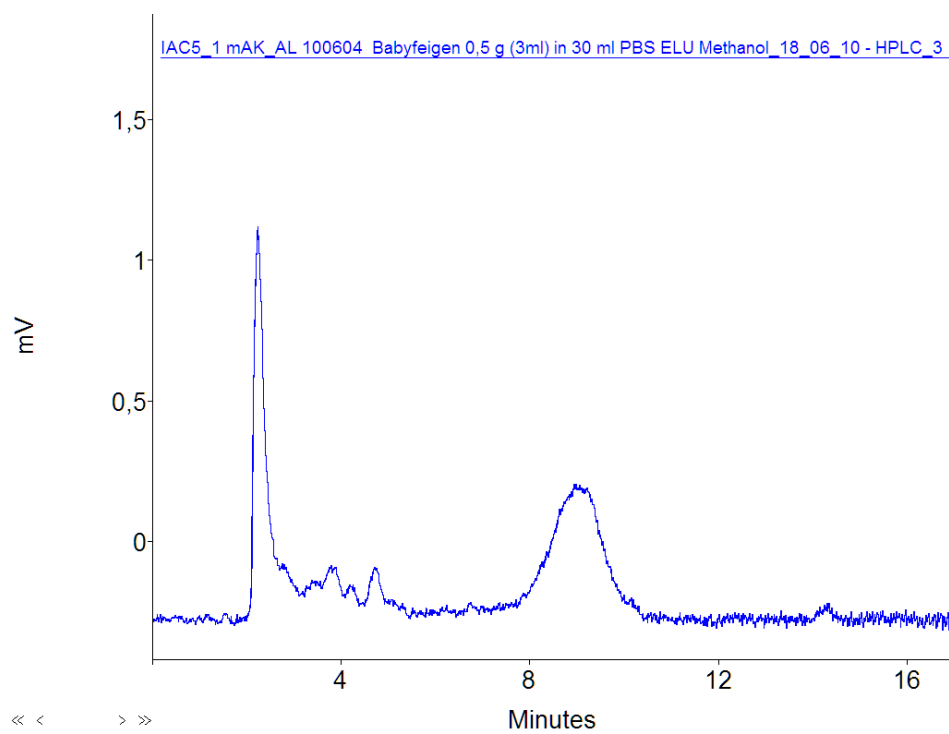


Abb. 29: Chromatogramm einer Babyfeigenprobe

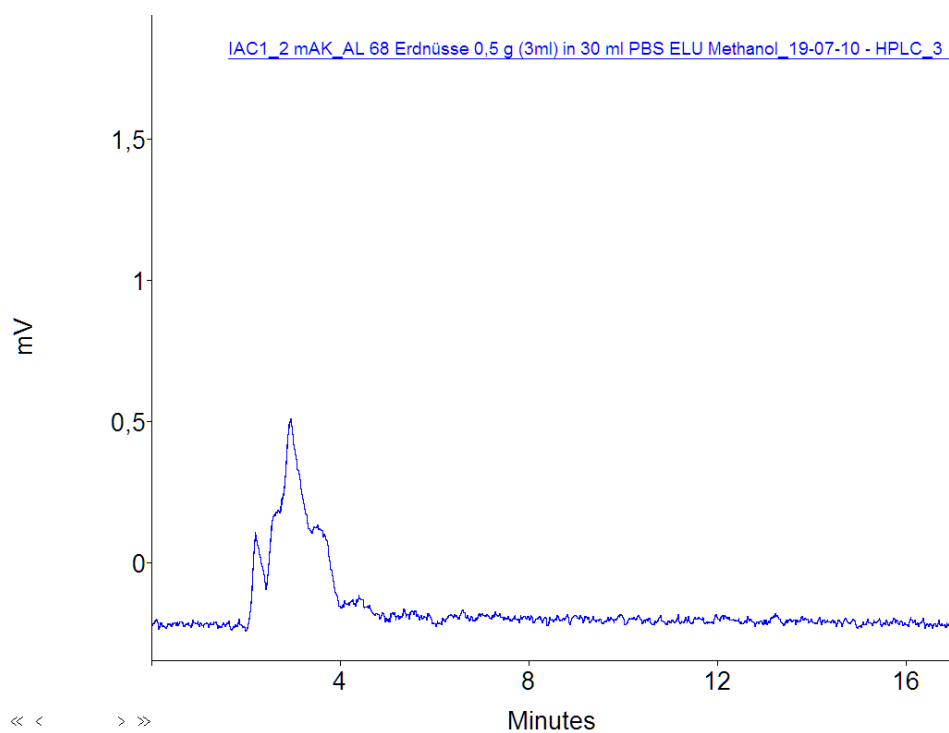


Abb. 30: Chromatogramm einer negativen Erdnussprobe

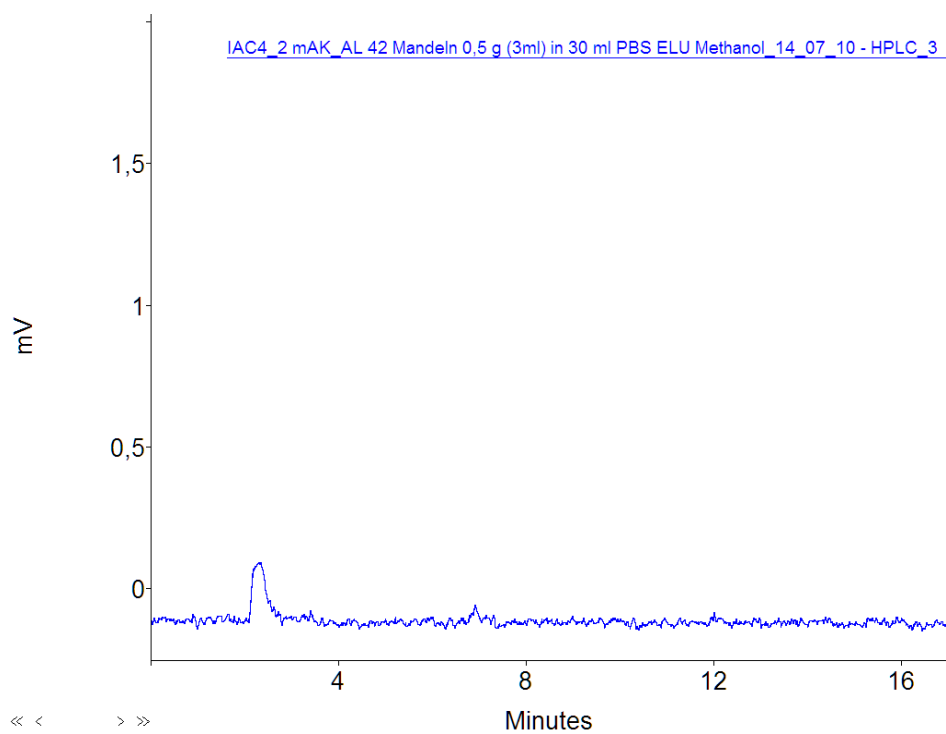


Abb. 31: Chromatogramm einer Mandelprobe

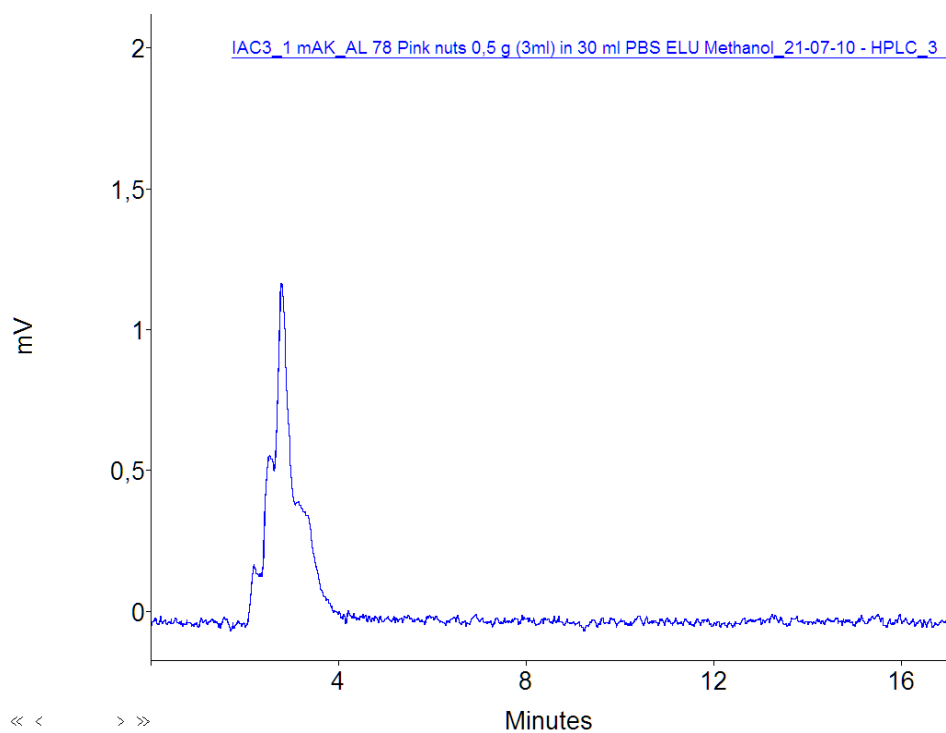


Abb. 32: Chromatogramm einer Pink Nut Probe

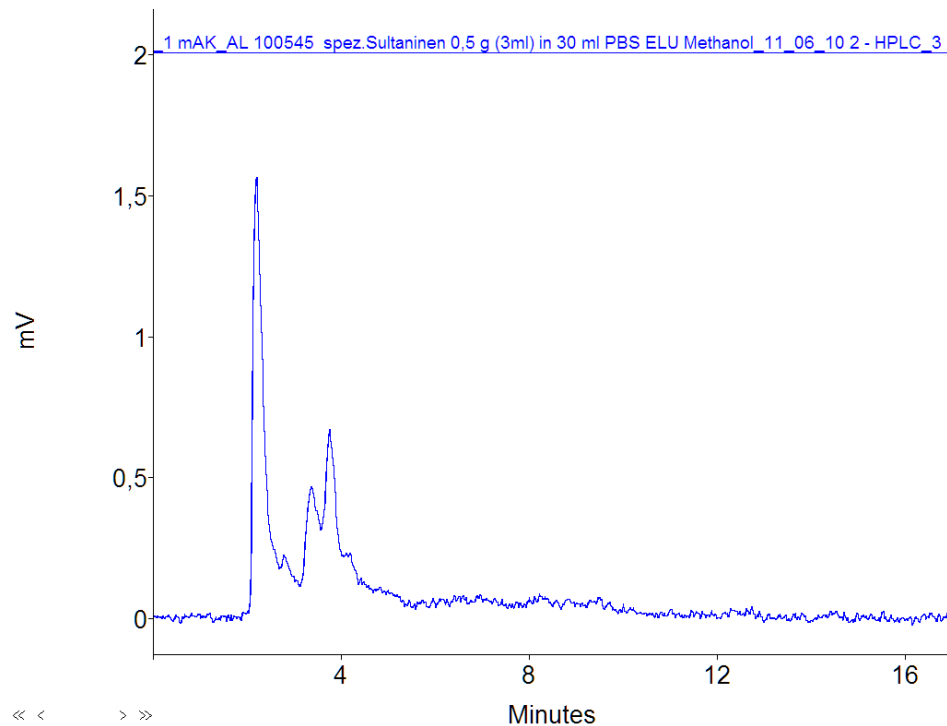


Abb. 33: Chromatogramm einer negativen Sultaninenprobe

In 16 von 98 Lebensmittelproben konnten AFs nachgewiesen werden, wobei alle positiven Lebensmittelproben Pistazien waren.

Die Anfälligkeit von Pistazien mit Aflatoxinen ist, auf unsachgemäße Lagerung zurückzuführen. Iran ist weltweit der größte Pistazienproduzent und –exporteur [CHERAGHALI et. al., 2007]. Neben dieser Diplomarbeit wurden bereits in zahlreichen Ländern die natürliche Aflatoxinkonzentration von Pistazien ermittelt. Ein Bericht von Mexiko beschreibt 2,2 % der untersuchten Pistazienproben mit Aflatoxingehalte über 20 ng/g, ein anderer aus Japan 2 % mit AFB₁-Werten über 10 ng/g [JECEFA, 1998]. Eine Arbeit aus Schweden berichtet von einer Aflatoxinkonzentration von mehr als 2 ng/g in 9,5 % der Proben [THUVANDER et. al., 2001]. In Holland hingegen wurde in 17 von 29 Pistazienproben AFB₁-Werte von 0,8 ng/g bis 165 ng/g gefunden [SCHOLTEN und SPANJER, 1996]. In einer Studie aus dem Iran, in der 10068 Pistazienproben für den Export in die EU untersucht wurden, konnten in 2852 Proben (28,3 %) AFT-Mengen zwischen 0,4 - 7,3 ng/g nachgewiesen wurden [CHERAGHALI et. al., 2007]. Die gesetzlich festgelegten EU-Höchstwerte für die Gesamtaflatoxine wurde in dieser Arbeit jedoch nicht überschritten. Der Anteil der kontaminierten Pistazien-

proben (%) ist mit dem Anteil, der in dieser Arbeit ermittelten positiven Proben (34%) vergleichbar. Hier lagen Ergebnisse sogar 44-mal über den gesetzlich festgelegten Höchstwerten. Höhere Aflatoxinkonzentration wurden in der bereits in Tab. 4 erwähnte Studie mit Werten bis 1430 ng/g AFT in Pistazienproben, wobei in 45 % Aflatoxine nachgewiesen werden konnten, beschrieben [JUAN et. al., 2007].

In dieser Arbeit waren von den an Wiener Märkten erworbenen insgesamt 98 Lebensmittelproben ausschließlich Pistazien kontaminiert. Die höchste Konzentration an Aflatoxinen enthielten geschälte Pistazien, wobei ein Anstieg der Aflatoxinkonzentrationen durch das Entfernen der Schalen hervorgerufen sein könnte. Die Bildung von Aflatoxinen wird durch unsachgemäße Lagerung beziehungsweise unzureichende Trocknung der Früchte begünstigt. Obwohl innerhalb der Europäischen Union Pistazien aus dem Iran und der Türkei verstärkt bei der Einfuhr kontrolliert werden, können dennoch Produkte mit sehr hohen Aflatoxingehalten auf den Europäischen Markt gelangen. Ursache hierfür könnte die inhomogene Verteilung von Aflatoxinen im Probengut sein. Um Chargen mit Aflatoxinkonzentrationen über den festgelegten Höchstwerten erkennen zu können, ist neben einer guten Analytik auch auf eine fachgerechte Probennahme zu achten.

9 Schlussbetrachtung

Die größte Herausforderung dieser Diplomarbeit lag in der Etablierung einer Methode für die Aufarbeitung der einzelnen Lebensmittelproben. Verdünnungen, insbesondere die Slurry-Herstellung, mussten auf die einzelnen Lebensmittelmatrixen angepasst werden, wobei ein Kompromiss in dem Verhältnis Wasser zu Lebensmittel 1:1 für Trockenfrüchte gefunden wurde. Auch beim Auftragen der Proben auf die IAC-Säulen mussten die Extrakt-Mengen so gewählt werden, dass die PBS-Mengen für Auftrage- und Waschlösungen relativ klein gehalten wurden, um die Arbeitszeit nicht unnötig zu verlängern. Bei den Proben E_100701, E_100723 und E_100724 mit hoher Gesamtaflatoxinkonzentration wurden schließlich nur mehr 1 ml (also 0,167 g) Probe aufgetragen, damit keine Standards über eine Konzentration von 100 ng/ml herangezogen werden mussten bzw. damit die Kapazität der Säule nicht überschritten wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass nur Pistazien als positive Lebensmittelproben identifiziert wurden, wobei die geschälten und die gehackten Pistazien die höchsten Konzentrationen aufwiesen. Die Kontamination mit aflatoxinbildenden Schimmelpilzen wurde vermutlich durch unsachgemäßer Lagerung und Verarbeitung gefördert.

10 Zusammenfassung

Aflatoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Lagerpilzen. Sie werden hauptsächlich von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildet. Die wichtigsten Vertreter der Aflatoxine sind B₁, B₂, G₁, G₂ und die sogenannten Milchtoxine M₁ und M₂. Das am gefährlichsten und mengenmäßig am häufigsten in Lebensmitteln enthaltenen Aflatoxin ist B₁ (AFB₁), welches vor allem lebertoxisch wirkt. Hohe Aflatoxin-Konzentrationen sind in einige fettreiche pflanzliche Lebensmittel (Erdnüsse, Pistazien, Mandeln, Haselnüsse, etc...) sowie manchen Trockenfrüchte (Feigen, Datteln) und bestimmten Getreidearten (Mais, Hirse, Weizen, Reis) zu finden. Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden einige am österreichischen Markt erhältlichen Trockenfrüchte (Feigen, Babyfeigen, Rosinen, Aprikosen, Datteln, Sultaninen, Maulbeeren) und Nüsse (Pistazien, Mandeln, Erdnüsse) auf ihre Aflatoxinkonzentration untersucht. Diese wurde an die zu analysierenden Matrix angepasst. Einerseits wurden Trockenfrüchte zerkleinert und mit Wasser verdünnt wurden (Herstellung von Slurries) um eine möglichst homogene Verteilung der Probenbestandteile zu erreichen, andererseits wurden Nüsse und Schalenfrüchte fein vermahlen. Extraktion und Clean-up wurden entsprechend der zu untersuchenden Matrix optimiert. Ein Aliquot (3ml = 0.5 g Probe) wurde auf die Immunaффinitätssäulchen aufgebracht, nach einem Waschschriff mit PBS und nachvollgender Elution wurde dieses mittels HPLC-FLD bestimmt. Die Validierung der Methode erfolgte mit zertifiziertem Referenzmaterials von Fapas (T04150), durch Bestimmung der Wiederfindung innerhalb eines Tages, sowie an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 98 Lebensmittelproben untersucht, wovon in 16 (16%) Proben Aflatoxine nachgewiesen werden konnten, wobei es sich nur um Pistazien handelte. In 12 Pistazienproben konnten Konzentrationen über der Quantifizierungsgrenze gemessen werden. In 4 Pistazienproben (4%) konnten sogar extrem hohe Konzentrationen bestimmt werden, die die EU Höchstwerte bis 44 Mal überschritten.

11 Summary

Aflatoxins are secondary metabolites of storage fungi. They are mainly produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The most important aflatoxins are B₁, B₂, G₁, G₂, and the so-called milk toxins M₁ and M₂. Aflatoxin B₁ (AFB₁), which acts primarily hepatotoxic, is the most toxic and most dominant aflatoxin. In general, high concentrations of aflatoxins have reported in some fatty plant foods (peanuts, pistachios, almonds, hazelnuts, etc.) dried fruits (figs, dates) as well as certain types of grains (maize, millet, wheat, rice).

In the present work, dried fruits (figs, baby figs, raisins, apricots, dates, sultanas, mulberries) and nuts (pistachios, almonds, and peanuts) were purchased from the markets in Vienna and analysed for their aflatoxin content. The sample preparation was performed by immunoaffinity chromatography prior to HPLC-FLD determination. Sample preparation was optimized for the commodities. While with dried fruits and distilled with water slurries were produced, nuts were ground fine. Purification and extraction of the sample was optimized for each commodity. An aliquot was taken (usually 0.5 g sample), diluted and applied on the immunoaffinity columns. The validation of the whole method was performed on certified reference material from FAPAS, where recoveries within one day and on three consecutive days were determined. A total of 98 food samples were evaluated for their aflatoxin content. In the present work only pistachios were identified as AF-positive commodities. The results indicated that 16 samples (16%) contained detectable concentrations of aflatoxins. In detail in 12 pistachios samples concentrations above the quantification limit were measured. However, in 4 pistachios samples (4%) the maximum levels of AFs in pistachios were exceeded dramatically.

12 Literaturverzeichnis

AKSOY U, ELTEM R, MEYVACI KB, ALTINDISLI A, KARABAT S, (2007) Five-year survey of ochratoxin A in processed sultanas from Turkey. Food Additives and Contaminants, 24 (3): 292-296.

BIRCAN C, (2009) Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs. Food and Chemical Toxicology, 47: 1996–2001.

BIRCAN C, BARRINGER S A, ULKEN U, PEHLIVAN R, (2008) Aflatoxin levels in dried figs, nuts and paprika for export from Turkey, International Journal of Food Science and Technology, 43: 1492–1498.

BISELLI S, (2006) Analytische Methoden für die Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln auf Mykotoxine, J. Verb. Lebensm. (1): 106-114.

CAMMAN K, (2001) Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg

CHERAGHALI A M, YAZDANPANA H, DORAKI N, ABOUHOSSAIN G et. al., (2007) Incidence of Aflatoxins in Iran pistachio nuts. Food and Chemical Toxicology, 45: 812-816

EL KHOURY A, RIZK T , LTEIF R , AZOURI H , DELIA M L , LEBRIHI A, (2008) Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts, Food and Chemical Toxicology 46: 2244–2250

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2010a) VERORDNUNG (EU) Nr. 165/2010 DER KOMMISSION vom 26. Februar 2010 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Aflatoxinen, Amtsblatt der Europäischen Union L50: 8-12

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2010b) VERORDNUNG (EU) Nr. 178/2010 DER KOMMISSION vom 2. März 2010 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 hinsichtlich Erdnüssen, sonstigen Ölsaaten, Nüssen, Aprikosenkernen, Süßholz und pflanzlichem Öl, Amtsblatt der Europäischen Union L52: 32-43

GEY M H, (2008) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik – Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen, 2. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg

GONZÁLEZ-OSNAYA, L., SORIANO, J.M., MOLTÓ, J.C., MAÑES, J. (2008) Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk. Food Chemistry 108: 272-276.

http://www.ages.at/uploads/media/Futtermittelbroschuere-2008_04.pdf (Zugriff: 15.9.2010)

<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=searchResultList> (Zugriff: 11.9.2010)

IAMANAKA B T, MENEZES H C, VICENTE E, LEITE R S F, TANIWAKI M H, (2007) Aflatoxigenic fungi and aXatoxins occurrence in sultanas and dried Figs commercialized in Brazil, Food Control 18: 454–457

JECFA (1998) Forty-ninth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. In: Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Aflatoxins WHO Food Additives Series 40. WHO, Gneva, pp. 359-469

JUAN C, ZINEDINE A, MOLTO´ J C, IDRISSE L, MANˆES J, (2008) Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Sale´ area, Morocco, Food Control 19: 849–853

KARAZA H, NAS S, (2006) Aflatoxins, Patulin and ergosterol contents of dried figs in Turkey, Food Additives and Contaminants, 23(5):502-508

KLICH MA, (2007) Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, Micoscience, 48:71-80

KOLOSOVA A Y, SHIM W B, YANG Z Y, EREMIN S A, CHUNG D H, (2006) Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1, Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. Anal. Bioanal. Chem. 384: 286-294

KRÄMER J, (2007) Lebensmittel-Mikrobiologie, 5. Auflage, Eugen Ulmer Verlag Stuttgart

KÜCK U, NOWROUSIAN M, HOFF B, ENGH I, (2009) Schimmelpilze-Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung, 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

LOTTSPEICH F, W. ENGELS J, (2009) Bioanalytik, 2. Auflage 2006, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

MONACI, L., TANTILLO, G., PALMISANO, F. (2004) Determination of ochratoxin A in pig tissues by liquid-liquid extraction and clean-up and high-performance liquid chromatography. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378: 1777-1782.

MORTIMER C, MÜLLER U, (2003) Chemie, Das Basiswissen der Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart,

MÜCKE W, LEMMEN CH, (2004) Schimmelpilze, 3. Auflage, Ecomed Medizin, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH

NAU H, STEINBERG P, KIETZMANN M, (2003) Lebensmitteltoxikologie Rückstände und Kontaminanten: Risiken und Verbraucherschutz, Blackwell Verlag, Berlin

PAWLISZYN, J. (2002) Chapter 13 Solid phase microextraction; Comprehensive Analytical Chemistry. In J. Pawliszyn (ed.): Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory. Volume 37, Elsevier,

PITTET, A., ROYER, D. (2002) Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 µg/kg. Journal of Agricultural and Food Chemistry 20: 243-247.

RAZZAZI-FAZELI E, REITER E.V, (2010). Sample preparation and clean up for mycotoxin analysis: principles, applications and recent developments. In: Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed. S. De Saeger, Woodhead publishing. 37-70.

REISS J, (1998) Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin

REITER, ZENTEK, RAZZAZI, (2009). Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. Mol. Nut. Food Res., 53: 508-524.

RISTICEVIC, S., NIRI, V., VUCKOVIC, D., PAWLISZYN, J. (2009): Recent developments in solid-phase microextraction. Analytical and Bioanalytical Chemistry 393: 781-795.

SKOOG D A, LEARY J J, (1996) Instrumentelle Analytik, Grundlagen – Geräte - Anwendungen, Springer Verlag, Berlin Heidelberg

SOLFRIZZO M, PANZARINI G, VISCONTI A, (2008) Determination of Ochratoxin A in grapes, dried vine fruits, and winery byproducts by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection (HPLC-FLD) and immunoaffinity cleanup. Journal of Agriculture. Food Chem. 56: 11081-11086

SPANJER M C, SCHOLTEN J M, KASTRUP S, JÖRISSEN U, SCHATZKI T F, TOYOFUKU N, (2006) Sample comminution for Mycotoxin analysis: Dry milling or slurry mixing? Food Additives and Contaminants. 23(1): 73-83

STROKA J, ANKLAM E, (2000) Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography using Post-Column bromination for determination of Aflatoxins in peanut butter, Pistacchio, Fig Paste, and Paprika Powder: Collaborative Study. Journal of AOAC International. 83/2

THUVANDER A, MOLLER T, BARBIERI H E, JANSSON A, SALOMONSSON A C, OLSEN M, (2001) Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. Food Additives and Contaminants. 18: 696-706.

WEISS C, (2010a) Mykotoxine (Teil1). Ernährungsumschau. 57(6): 316-324.

WEISS C, (2010b) Mykotoxine (Teil 2), Ernährungsumschau 7/10, 2010; 374-382

13 Lebenslauf

Beata Feiler-Faragó

Geboren: 02.06.1983, Budapest

Familienstand: verheiratet

Eltern: Dr. Eva Borsányi

Dr. István Faragó

Anschrift: Webgasse 27/10
1060, Wien



Ausbildung:

1989-1997: Grundschule- Mérnök utcai Általános Iskola (1119 Budapest, Mérnök u. 39)

1997-1998: Cystercienser Gymnasium in Budapest- Budai Ciszterci Szent Imre Gimnázium (1114 Budapest, Villányi út 27)

1998-2002: Oberstufenrealgymnasium "St. Ursula" der Diözese Gurk (9020 Klagenfurt, Ursulinengasse 5, DVR: 0064131)

Schwerpunkte der Unterricht waren EDV und Musikerziehung

2007: Snowboardlehrausbildung (USI – Wien, abgeschlossen am 18.02.2007)

2002-2010 : Studium an der Universität Wien, Fach: Ernährungswissenschaften A474

Studentin im zweiten Abschnitt, der Abschluss des ersten Abschnittes wurde am 02.06.2006 von der Universität Wien bestätigt.

Fremdsprachen: Deutsch, Ungarisch, Englisch, Italienisch

Praktika: Assistenz, Del Mar Gastronomie GmbH

Leistungsphysiologie an der Pulmonologie, AKH

Veterinärmed. Universität Wien, Institut für Ernährung (2010)